

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 156**

51 Int. Cl.:

A61K 9/22 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/30 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/US2010/060564**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10842554 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2515942**

54 Título: **Composiciones terapéuticas de nanopartículas poliméricas con alta temperatura de transición vítrea o copolímeros de alto peso molecular**

30 Prioridad:

16.12.2009 US 286897 P

22.10.2010 US 405778 P

15.12.2009 US 286559 P

22.02.2010 US 306729 P

16.12.2009 US 286831 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.08.2020

73 Titular/es:

PFIZER INC. (100.0%)

235 East 42nd Street

New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

ALI, MIR, MUKKARAM;

SABNIS, ABHIMANYU;

DEWITT, DAVID;

TROIANO, GREG;

WRIGHT, JAMES;

FIGUEIREDO, MARIA;

FIGA, MICHAEL;

VAN GEEN HOVEN, TINA;

SONG, YOUNG-HO;

AUER, JASON y

CAMPBELL, TARIKH, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 780 156 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones terapéuticas de nanopartículas poliméricas con alta temperatura de transición vítrea o copolímeros de alto peso molecular

Antecedentes

5 Los sistemas que administran ciertos fármacos a un paciente (por ejemplo, dirigidos a un tipo de tejido o célula en particular o dirigidos a un tejido enfermo específico, pero no a un tejido normal), o que controlan la liberación de fármacos han sido reconocidos durante mucho tiempo como beneficiosos. Por ejemplo, los agentes terapéuticos que incluyen un fármaco activo y que son capaces de ser ubicados en un tipo de tejido o célula particular, por ejemplo, un
10 tejido enfermo específico, pueden reducir la cantidad del fármaco en los tejidos del cuerpo que no requieren tratamiento. Esto es particularmente importante cuando es tratada una afección tal como el cáncer en que es conveniente administrar una dosis citotóxica del fármaco a las células cancerosas sin destruir el tejido no canceroso circundante. Además, tales agentes terapéuticos pueden reducir los efectos secundarios indeseables y, a menudo, potencialmente mortales, comunes en la terapia anticáncer. Por ejemplo, los agentes terapéuticos de nanopartículas, debido al pequeño tamaño, pueden evadir el reconocimiento dentro del cuerpo, lo que permite una administración
15 dirigida y controlada mientras que, por ejemplo, permanecen estables durante un período de tiempo eficaz.

Los agentes terapéuticos que ofrecen dicha terapia y/o liberación controlada y/o terapia dirigida también deben poder administrar una cantidad eficaz de fármaco. Puede ser un desafío preparar sistemas de nanopartículas que tengan una cantidad apropiada de fármaco asociada con cada nanopartícula, mientras es mantenido el tamaño de las nanopartículas lo suficientemente pequeño como para tener propiedades de administración ventajosas. Por ejemplo,
20 aunque es deseable cargar una nanopartícula con una gran cantidad de agente terapéutico, las preparaciones de nanopartículas que usan una carga de fármaco que es demasiado alta dan como resultado nanopartículas que son demasiado grandes para un uso terapéutico práctico. Además, puede ser deseable que las nanopartículas terapéuticas permanezcan estables de modo de, por ejemplo, limitar sustancialmente la liberación rápida o inmediata del agente terapéutico.

25 Por consiguiente, existe la necesidad de nuevas formulaciones de nanopartículas y procedimientos para fabricar tales nanopartículas y composiciones, que puedan administrar niveles terapéuticos de fármacos para tratar enfermedades tales como el cáncer, mientras que son reducidos los efectos secundarios del paciente.

El documento WO-2010/005725 desvela nanopartículas poliméricas terapéuticas que comprenden alcaloides de la vinca.

30 El documento WO-2011/072218 desvela composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden nanopartículas poliméricas que, tras la reconstitución, tienen bajos niveles de partículas de más de 10 micrones de tamaño.

Los documentos US-2006/034925 y WO-2004/089291 desvelan una composición para administrar un agente terapéutico tumoral a un paciente que incluye una formulación de liberación rápida de un agente inductor de apoptosis tumoral, una formulación de liberación lenta de un agente terapéutico tumoral y un portador farmacéuticamente
35 aceptable.

El documento WO-2011/084521 desvela nanopartículas terapéuticas que comprenden epotilona y un polímero biocompatible.

Sumario

40 En la presente es proporcionado un procedimiento para evaluación de suspensiones de nanopartículas para identificar una suspensión con una tasa de liberación de fármaco específica, que comprende:

(a) preparar por separado una pluralidad de suspensiones que tienen nanopartículas que comprenden un agente terapéutico, y 10 a 99 por ciento en peso de uno o más copolímeros en bloque que tienen al menos una porción hidrófoba seleccionada de ácido poli(D,L-láctico) o ácido poli(láctico)-ácido co-poli(glicólico) y al menos una porción hidrófila que es un poli(etilenglicol), y opcionalmente 0 a 75 por ciento en peso de un homopolímero
45 seleccionado de ácido poli(D,L-láctico); en el que cada suspensión está en un compartimiento separado, cada suspensión comprende nanopartículas que tienen un peso molecular predeterminado del copolímero en bloque y si está presente, un peso molecular predeterminado del homopolímero;

(b) determinar la temperatura de transición vítrea de las nanopartículas cargadas con fármaco en cada una de las suspensiones; y

50 (c) identificar la suspensión que tiene nanopartículas cargadas con fármaco con una temperatura de transición vítrea predeterminada entre 37 °C y 39,5 °C, 39,5 °C y 41 °C o 42 °C y 50 °C, identificado de este modo una suspensión con la tasa de liberación de fármaco específica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un flujograma para un procedimiento de emulsión para formar nanopartículas desveladas.

La Figura 2 es un diagrama de flujo para un procedimiento de emulsión desvelado.

La Figura 3 es una curva de DSC de poli(D,L-láctido)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-PEG, M_n bloque de PLA = 16 kDa; M_n bloque de PEG = 5 kDa) cuando es recuperado de una polimerización por fusión y que ha sido enfriado a una tasa de enfriamiento desconocida.

La Figura 4A es una curva de DSC de poli(D,L-láctido)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-PEG, M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa) cuando es recuperado de una precipitación de la solución polimérica (100 mg/ml en diclorometano) en una mezcla binaria sin disolvente (dietil éter/hexano = 70/30 (v/v)); la Figura 4B son curvas de DSC que muestran transiciones vítreas observadas en copolímeros en bloque de PLA-PEG de pesos moleculares crecientes. El peso molecular promedio en número del bloque de PLA, M_n = 10K Da (curva inferior), 15 KDa, 30 KDa y 50 KDa; la Figura 4C muestra la dependencia de T_g sobre el peso molecular (M_n) de PLA en copolímeros en bloque de PLA-PEG.

La Figura 5 es una curva de DSC de poli(D,L-láctido) (PLA, M_n = 6 kDa) cuando es recuperado de un proceso de precipitación.

La Figura 6A representa una curva de DSC de poli(D,L-láctido) (PLA, M_n = 75 kDa) cuando es recuperado de un proceso de precipitación; la Figura 6B representa curvas de DSC modulada que muestran las temperaturas de transición vítrea en el homopolímero poli(D,L-láctido) de pesos moleculares promedio en número (M_n) 1,7 KDa (más bajo), 4,3 KDa, 6 KDa, 10 KDa, 22 KDa, y 120 KDa; la Figura 6C muestra la dependencia de T_g del peso molecular promedio en número (M_n) de los homopolímeros de PLA.

La Figura 7 es una ilustración de los cinco puntos usados para definir las transiciones endotérmicas observadas en el análisis de DSC de las nanopartículas.

La Figura 8 es una curva de DSC que muestra la transición vítrea endotérmica observada en las nanopartículas compuestas de una mezcla de PLA-PEG (M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa) y homopolímero de PLA de peso molecular bajo (M_n = 20 6,5 kDa).

La Figura 9 es una curva de DSC que muestra la transición vítrea endotérmica observada en nanopartículas compuestas de PLA-PEG (M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa) como el único componente polimérico de la partícula.

La Figura 10 es una curva de DSC que muestra la transición vítrea endotérmica observada en nanopartículas compuestas de una mezcla de PLA-PEG (M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa) y homopolímero de PLA de alto peso molecular (M_n = 75 kDa).

La Figura 11A muestra una curva DSC que muestra la transición vítrea endotérmica observada en nanopartículas compuestas de una mezcla de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y homopolímero de PLA de alto peso molecular (M_n = 75 kDa).

La Figura 12 es una comparación de tasas de liberación de docetaxel (DTXL) de nanopartículas en base a componentes poliméricos diferentes como es detallado en la leyenda del gráfico.

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura sobre las tasas de liberación de fármaco durante 24 horas de sistemas de nanopartículas que exhiben diferentes temperaturas de transición vítrea.

La Figura 14 es un gráfico que muestra una expansión del período de tiempo de 1-4 horas del estudio dado en la Figura 13.

La Figura 15 representa la liberación *in vitro* de docetaxel de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria.

La Figura 16 representa la liberación *in vitro* de bortezomib de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria.

La Figura 17 representa la liberación *in vitro* de vinorelbina de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria.

La Figura 18 representa la liberación *in vitro* de vincristina de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria.

La Figura 19 representa la liberación *in vitro* de bendamustina HCl de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria.

La Figura 20 representa la liberación *in vitro* de epotilona B de diversas nanopartículas desveladas en la

presente memoria.

La Figura 21 representa la liberación *in vitro* de budesonida de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria. La Figura 22 representa la liberación *in vitro* de budesonida de diversas nanopartículas desveladas en la presente memoria.

5 La Figura 23 representa la farmacocinética de budesonida y nanopartículas de budesonida después de una dosis intravenosa única (0,5 mg/kg).

La Figura 24 indica puntuaciones de enfermedad en intestinos de rata en un modelo de IBD después del tratamiento con budesonida, budesonida PTNP y dexametasona.

10 La Figura 25 indica los pesos intestinales de rata en un modelo de IBD después del tratamiento con budesonida, budesonida PTNP y dexametasona.

La Figura 26 representa la liberación *in vitro* de budesonida en diversas nanopartículas.

Descripción detallada

15 La presente divulgación se refiere a nanopartículas terapéuticas biocompatibles de liberación rápida que tienen una temperatura de transición vítrea entre 37 °C y 39,5 °C, y/o suspensiones acuosas farmacéuticas que incluyen una pluralidad de nanopartículas terapéuticas biocompatibles de liberación moderada que tienen una temperatura de transición vítrea entre 39,5 °C y 41 °C, y/o suspensiones acuosas farmacéuticas de liberación lenta que incluyen una pluralidad de nanopartículas que tienen una temperatura de transición vítrea entre 42 °C y 50 °C. Las nanopartículas desveladas incluyen un agente terapéutico y un copolímero en bloque que tiene al menos una porción hidrófoba y al menos una porción hidrófila.

20 Por ejemplo, una suspensión acuosa farmacéutica puede comprender una pluralidad de nanopartículas terapéuticas biocompatibles de liberación rápida que tienen una temperatura de transición vítrea entre 37 °C y 39,5 °C, en el que cada una de las nanopartículas comprende un agente terapéutico y un copolímero en bloque que tiene al menos una porción hidrófoba y al menos una porción hidrófila en el que las nanopartículas liberan 70% a 100% del agente terapéutico en cuatro horas en una prueba de disolución *in vitro*. Otra suspensión acuosa farmacéutica puede comprender una pluralidad de nanopartículas terapéuticas biocompatibles de liberación moderada que tienen una temperatura de transición vítrea entre 39,5 °C y 41 °C, en el que cada una de las nanopartículas comprende un agente terapéutico y un copolímero en bloque que tiene al menos una porción hidrófoba y al menos una porción hidrófila, y en el que las nanopartículas liberan 50% a 70% del agente terapéutico en cuatro horas en una prueba de disolución *in vitro*. Otra suspensión acuosa farmacéutica puede comprender una pluralidad de nanopartículas terapéuticas biocompatibles de liberación lenta que tienen una temperatura de transición vítrea entre 42 °C y 50 °C, en el que cada una de las nanopartículas comprende un agente terapéutico y un copolímero en bloque que tiene al menos una porción hidrófoba y al menos una porción hidrófila, en el que las nanopartículas liberan 50% o menos del agente terapéutico en cuatro horas en una prueba de disolución *in vitro*. Tales pruebas de disolución son bien conocidas en la técnica. Una de estas pruebas representativas es ejemplificada a continuación en el Ejemplo 7. Por ejemplo, una prueba de disolución puede incluir colocar la suspensión de solución salina tamponada con fosfato de hidroxipropilciclodextrina 2,5% en peso (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato 0,01 M) durante 1, 4, 8, 12 días o más.

35 Las nanopartículas desveladas pueden incluir 0,1 a 40 por ciento en peso, 0,2 a 35 por ciento en peso, 3 a 40 por ciento en peso, 5 a 30 por ciento en peso, 10 a 30 por ciento en peso, 15 a 25 por ciento en peso, o incluso 4 a 25 por ciento en peso de un agente activo, tal como agente antineoplásico, por ejemplo, un agente de taxano (por ejemplo, docetaxel).

40 Las nanopartículas desveladas en la presente memoria incluyen uno, dos, tres o más polímeros biocompatibles y/o biodegradables, tal como los descritos en la presente memoria. Estos incluyen 10 a 99 por ciento en peso de uno o más copolímeros en bloque y opcionalmente 0 a 75 por ciento en peso de PLA.

45 Los ejemplos de nanopartículas terapéuticas pueden incluir 40 a 99, o 50 a 90 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) o 40 a 80 por ciento en peso copolímero de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol). Tal copolímero de ácido poli(láctico)-bloque-poli(etilenglicol) puede incluir poli(ácido láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de 15 a 20 kDa (o por ejemplo 15 a 100 kDa, por ejemplo, 15 a 80 kDa), y poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular promedio en número de 2 a 10 kDa, por ejemplo, 4 a 6 kDa. Por ejemplo, una nanopartícula terapéutica desvelada puede incluir 70 a 90 por ciento en peso de PLA-PEG y 15 a 25 por ciento en peso de agente activo, o 30 a 50 por ciento en peso de PLA-PEG, 30 a 50 por ciento en peso (o 30 a 75 por ciento en peso) de PLA o PLGA, y 15 a 25 por ciento en peso de agente activo. Tal PLA (ácido (poli)láctico) puede tener un peso molecular promedio en número de 5 a 10 kDa. Tal PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico) puede tener un peso molecular promedio en número de 8 a 12 kDa.

55 En otras realizaciones, las nanopartículas desveladas en la presente memoria incluyen copolímero dibloque de ácido poli(láctico)poli(etilenglicol) de alto peso molecular o un copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilenglicol) de alto peso molecular. Por ejemplo, un copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) que

comprende ácido poli(láctico) puede tener un peso molecular promedio en número de 30 kDa a 90 kDa, o 40 kDa a 90 kDa. En otra realización, un copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilen)glicol comprende ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico) que tiene un peso molecular promedio en número de 30 kDa a 90 kDa, o 40 kDa a 90 kDa. Por ejemplo, una nanopartícula contemplada puede incluir 0,1 a 40 por ciento en peso de un agente terapéutico y 10 a 90 por ciento en peso de un copolímero dibloque ácido poli(láctico)poli(etilen)glicol, en el que el copolímero de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol comprende ácido poli(láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de 30 kDa a 90 kDa, o 40 kDa a 90 kDa. En una realización, el ácido poli(láctico) tiene un peso molecular promedio en número de 30 kDa. En otra realización, el ácido poli(láctico) tiene un peso molecular promedio en número de 50 kDa a 80 kDa, o 70 kDa a 85 kDa. En aún otra realización, el ácido poli(láctico) tiene un peso molecular promedio en número de 50 kDa. En algunas realizaciones, el copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol o el copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilen)glicol comprende poli(etilen) glicol que tiene un peso molecular de 4 kDa a 6 kDa, o 4 kDa a 12 kDa. Por ejemplo, el poli(etilen) glicol puede tener un peso molecular promedio en número de 5 kDa o 10 kDa.

Las nanopartículas desveladas opcionalmente pueden incluir 1 a 50 por ciento en peso o 1 a 70 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-ácido co-poli(glicólico) (que no incluye PEG, por ejemplo, un homopolímero de PLA), u opcionalmente puede incluir 1 a 75 por ciento en peso, o 10 a 50 por ciento en peso o 30 a 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)ácido co-poli(glicólico). En una realización, las nanopartículas desveladas pueden incluir dos polímeros, por ejemplo, PLA-PEG y PLA, en una relación de peso de 40:60 a 60:40, o 30:50 a 50:30, por ejemplo, 50:50.

Tal ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico) sustancialmente homopolimérico puede tener un peso molecular promedio en peso de 4,5 a 130 kDa, por ejemplo, 20 a 30 kDa, o 100 a 130 kDa. Tal PLA homopolimérico puede tener un peso molecular promedio en número de 4,5 a 90 kDa, o 4,5 a 12 kDa, 5,5 a 7 kDa (por ejemplo, 6,5 kDa), 15 a 30 kDa, o 60 a 90 kDa. El ejemplo de PLA homopolimérico puede tener un peso molecular promedio en número de 70 o 80 kDa o un peso molecular promedio en peso de 124 kD. Como se muestra en la técnica, el peso molecular de los polímeros se puede relacionar con una viscosidad inherente. En algunas realizaciones, el homopolímero de PLA puede tener una viscosidad inherente de 0,2 a 0,4, por ejemplo, 0,4; en otras realizaciones, PLA puede tener una viscosidad inherente de 0,6 a 0,8. El ejemplo de PLGA puede tener un peso molecular promedio en número de 8 a 12 kDa.

Por ejemplo, es proporcionada en la presente memoria una nanopartícula polimérica terapéutica biocompatible que comprende 0,1 a 40 por ciento en peso de un agente terapéutico; y 10 a 90, o 10 a 99, o 70 a 99 por ciento en peso de polímero biocompatible, en el que el polímero biocompatible es seleccionado del grupo que consiste en a) un copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol, en el que el copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol comprende ácido poli(láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de 30 kDa a 90 kDa; y b) un copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilen)glicol, en el que el copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilen)glicol comprende ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico) que tiene un peso molecular promedio en número de 30 kDa a 90 kDa. El copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol o el copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilen)glicol puede incluir poli(etilen)glicol que tiene un peso molecular de 4 kDa a 12 kDa, por ejemplo, un copolímero dibloque de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol puede incluir ácido poli(láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de 30 kDa y poli(etilen)glicol que tiene un peso molecular promedio en número de 5 kDa, o puede incluir ácido poli(láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de 50 kDa a 80 kDa y poli(etilen)glicol que tiene un peso molecular promedio en número de 5 kDa o 10 kDa, por ejemplo, ácido poli(láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de 50 kDa y poli(etilen)glicol que tiene un peso molecular promedio en número de 5 kDa.

En una realización, las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir un ligando de localización, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como cáncer de próstata, en un sujeto necesitado de dicho tratamiento. En ciertas realizaciones, el ligando de bajo peso molecular es conjugado con un polímero, y la nanopartícula comprende una determinada relación de polímero conjugado con ligando (por ejemplo, ligando PLA-PEG) a polímero no funcionalizado (por ejemplo, PLA-PEG o PLGA-PEG). La nanopartícula puede tener una relación optimizada de estos dos polímeros de manera que una cantidad eficaz de ligando esté asociada con la nanopartícula para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como el cáncer.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas también pueden comprender de 0,2 a 10 por ciento en peso de PLA-PEG funcionalizado con un ligando de localización tal como se divulga en la presente memoria, y/o pueden incluir de 0,2 a 10 por ciento en peso de bloque de ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico)-PEG funcionalizado con un ligando de localización. Tal ligando de localización puede estar, en algunas realizaciones, unido covalentemente a PEG, por ejemplo, unido a PEG a través de un ligador de alquileno, por ejemplo, ligando de alquileno PLA-PEG. Por ejemplo, una nanopartícula divulgada puede incluir de 0,2 a 10 por ciento en moles de ligando PLA-PEG o ligando de ácido poli(láctico)-ácido co-poli(glicólico)-PEG.

En algunas realizaciones, las partículas y/o composiciones terapéuticas desveladas incluyen agentes de localización o formación de imágenes tal como colorantes, por ejemplo, colorante azul de Evans. Dichos colorantes pueden estar unidos o asociados con una partícula terapéutica, o las composiciones desveladas pueden incluir dichos colorantes. Por ejemplo, puede ser usado el colorante azul de Evans, que puede estar unido o asociado con albúmina, por ejemplo,

albúmina plasmática.

Las nanopartículas desveladas pueden tener una configuración sustancialmente esférica (es decir, las partículas generalmente aparentan ser esféricas) o no esféricas. Por ejemplo, las partículas, después del hinchamiento o la contracción, pueden adoptar una configuración no esférica.

5 Las nanopartículas desveladas pueden tener una dimensión característica menor que aproximadamente 1 micrómetro, la dimensión característica de una partícula es el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que la partícula. Por ejemplo, la partícula puede tener una dimensión característica de la partícula que puede ser menor que 300 nm, menor que 200 nm, menor que 150 nm, menor que 100 nm, menor que 50 nm, menor que 30 nm, menor que 10 nm, menor que 3 nm, o menor que 1 nm en algunos casos. En realizaciones particulares, las nanopartículas desveladas pueden tener un diámetro de 70 nm a 250 nm, o 70 nm a 180 nm, 80 nm a 170 nm, 80 nm a 130 nm.

10 En un conjunto de realizaciones, las partículas pueden tener un interior y una superficie, en las que la superficie tiene una composición diferente del interior, es decir, puede haber al menos un compuesto presente en el interior, pero no presente en la superficie (o viceversa), y/o al menos un compuesto está presente en el interior y en la superficie a diferentes concentraciones. Por ejemplo, en una realización, un compuesto, tal como un resto de localización (es decir, un ligando de bajo peso molecular) de un conjugado polimérico de la presente invención, puede estar presente tanto en el interior como en la superficie de la partícula, pero en una concentración más alta en la superficie que en el interior de la partícula, aunque en algunos casos, la concentración en el interior de la partícula puede ser esencialmente distinta de cero, es decir, hay una cantidad detectable del compuesto presente en el interior de la partícula.

15 En algunos casos, el interior de la partícula es más hidrófobo que la superficie de la partícula. Por ejemplo, el interior de la partícula puede ser relativamente hidrófobo con respecto a la superficie de la partícula, y un fármaco u otra carga útil puede ser hidrófobo y estar asociado fácilmente con el centro relativamente hidrófobo de la partícula. Por lo tanto, el fármaco u otra carga útil pueden estar contenidos en el interior de la partícula, que puede protegerlos del ambiente externo que rodea la partícula (o viceversa). Por ejemplo, un fármaco u otra carga útil contenidos dentro de una partícula administrada a un sujeto estará protegida del cuerpo del sujeto, y el cuerpo también puede estar sustancialmente aislado del fármaco durante al menos un período de tiempo.

20 Las nanopartículas desveladas pueden ser estables, por ejemplo, en una solución que puede contener un sacárido, durante al menos 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días o al menos 5 días a temperatura ambiente, o a 25 °C.

25 Las nanopartículas desveladas en la presente memoria pueden tener propiedades de liberación controlada, por ejemplo, pueden ser capaces de administrar una cantidad de agente activo a un paciente, por ejemplo, a un sitio específico en un paciente, durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, durante 1 día, 1 semana o más.

Definiciones

"Tratamiento" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminución, reducción, modulación o eliminación, que da como resultado la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares.

35 "Farmacéutica o farmacológicamente aceptable" describe entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando son administradas a un animal o un ser humano, según corresponda. Para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo requieren los estándares de la FDA Office of Biologics.

40 El término "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable", como es usado en la presente memoria, se refiere a cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o potenciadas.

45 "Individuo", "paciente" o "sujeto" son usados indistintamente e incluyen cualquier animal, que incluye mamíferos, tal como ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates, y más preferentemente seres humanos. Los compuestos y composiciones de la invención pueden ser administrados a un mamífero, tal como un ser humano, pero también pueden ser usados otros mamíferos tal como un animal necesitado de tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayos y similares). La "modulación" incluye antagonismo (por ejemplo, inhibición), agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

50 En la presente memoria descriptiva, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad del compuesto o composición presente que provoca la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que es buscada por el investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico. Los compuestos y composiciones de la invención son administrados en cantidades terapéuticamente efectivas para tratar una enfermedad. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto es la cantidad requerida para lograr un efecto terapéutico

y/o profiláctico deseado. El término "sales farmacéuticamente aceptables" como es usado en la presente memoria se refiere a sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en compuestos usados en las presentes composiciones. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza básica son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden ser usados para preparar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de tales compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, que incluyen pero sin limitación sales de malato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxí-3-naftoato)). Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que incluyen un resto amino pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con varios aminoácidos, además de los ácidos mencionados anteriormente. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales básicas con diversos cationes farmacológicamente aceptables. Los ejemplos de tales sales incluyen sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de calcio, magnesio, sodio, litio, zinc, potasio y hierro.

Polímeros

Las nanopartículas desveladas en la presente memoria incluyen una matriz de polímeros y un agente terapéutico.

En la presente memoria son contempladas nanopartículas que comprenden copolímeros. En la presente memoria son contempladas diversos pesos moleculares de polímeros, por ejemplo, el peso de un polímero puede influir en la velocidad de degradación de las partículas, la solubilidad, la absorción de agua y la cinética de liberación del fármaco. El peso molecular del polímero puede ser ajustado de modo que la partícula sea biodegradada en el individuo que siendo tratado dentro de un período de tiempo razonable (que oscila de unas pocas horas a 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, etc.). Por ejemplo, una partícula desvelada puede comprender un copolímero de PLA y PEG o PLGA y PEG, en donde la porción de PLA o PLGA puede tener un peso molecular promedio en número de 30 kDa a 90 kDa o 40 kDa a 90 kDa, y la porción de PEG puede tener un peso molecular de 4 kDa a 6 kDa. En un ejemplo de realización, la porción PLA o PLGA puede tener un peso molecular promedio en número de 30 kDa, 50 kDa, 65 kDa u 80 kDa. La porción de PEG puede tener un peso molecular de 5 kDa, 6, 7, 8 o 9 kDa, o 10 kDa.

Las nanopartículas desveladas incluyen un primer polímero que es un copolímero, por ejemplo, un copolímero dibloque, y opcionalmente un polímero es un homopolímero. Las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir un agente terapéutico que puede estar asociado con la superficie de, encapsulado dentro, rodeado por y/o dispersado en toda una matriz polimérica.

Las partículas desveladas incluyen copolímeros, que describen dos o más polímeros (tal como los descritos en la presente memoria) que han sido asociados entre sí mediante la unión covalente de los dos o más polímeros juntos. Por lo tanto, un copolímero puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que han sido conjugados juntos para formar un copolímero en bloque en el que el primer polímero puede ser un primer bloque del copolímero en bloque y el segundo polímero puede ser un segundo bloque del copolímero en bloque. Obviamente, los expertos en la técnica entenderán que un copolímero en bloque en algunos casos, puede contener múltiples bloques de polímero, y que un "copolímero en bloque", como es usado en la presente memoria, no está limitado solo a los copolímeros en bloque que tienen solo un primer bloque individual y un segundo bloque individual. Por ejemplo, un copolímero en bloque puede comprender un primer bloque que comprende un primer polímero, un segundo bloque que comprende un segundo polímero y un tercer bloque que comprende un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros en bloque pueden contener cualquier número de primeros bloques de un primer polímero y segundos bloques de un segundo polímero (y en ciertos casos, terceros bloques, cuartos bloques, etc.). Además, debe ser tenido en cuenta que los copolímeros en bloque también pueden ser formados, en algunos casos, a partir de otros copolímeros en bloque. Por ejemplo, un primer copolímero en bloque puede estar conjugado con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero en bloque, etc.), para formar un nuevo copolímero en bloque que contiene múltiples tipos de bloques y/u otros restos (por ejemplo, a restos no poliméricos).

En algunas realizaciones, un copolímero contemplado (por ejemplo, copolímero en bloque) puede ser anfífilo, es decir, que tiene una porción hidrófila y una porción hidrófoba, o una porción relativamente hidrófila y una porción relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo puede ser uno que generalmente atrae agua y un polímero hidrófobo puede ser uno que generalmente repele el agua. Se puede identificar un polímero hidrófilo o hidrófobo, por ejemplo, mediante la preparación de una muestra del polímero y medición de su ángulo de contacto con agua (típicamente, el polímero tendrá un ángulo de contacto menor de 60°, mientras que un polímero hidrófobo tendrá un ángulo de contacto mayor de aproximadamente 60°). En algunos casos, la hidrofiliidad de dos o más polímeros se puede medir uno con respecto al otro, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero. Por ejemplo, el primer polímero puede tener un ángulo de contacto menor que el segundo polímero.

En un conjunto de realizaciones, un polímero de alto peso molecular (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque) contemplado en la presente memoria incluye un polímero biocompatible, es decir, el polímero que normalmente no induce una respuesta adversa cuando es insertado o inyectado en un individuo vivo, por ejemplo, sin inflamación significativa y/o rechazo agudo del polímero por el sistema inmune, por ejemplo, a través de una respuesta

de células T. En consecuencia, las partículas terapéuticas contempladas en la presente memoria pueden ser no inmunogénicas. El término no inmunogénico como es usado en la presente memoria se refiere al factor de crecimiento endógeno en su estado nativo que normalmente no produce, o solo produce niveles mínimos, de anticuerpos circulantes, células T o células inmunes reactivas, y que normalmente no provoca en el individuo una respuesta inmune contra sí mismo.

La biocompatibilidad generalmente se refiere al rechazo agudo del material por al menos una porción del sistema inmune, es decir, un material no biocompatible implantado en un individuo provoca una respuesta inmune en el sujeto que puede ser suficientemente grave de modo tal que el rechazo del material por parte del sistema inmune el sistema no se puede controlar adecuadamente y, a menudo, es de tal grado que el material debe ser eliminado del sujeto. Una prueba simple para determinar la biocompatibilidad puede ser exponer un polímero a las células *in vitro*; los polímeros biocompatibles son polímeros que típicamente no producirán una muerte celular significativa a concentraciones moderadas, por ejemplo, a concentraciones de 50 microgramos/10⁶ células. Por ejemplo, un polímero biocompatible puede causar menos de aproximadamente 20% de muerte celular cuando es expuesto a células tal como fibroblastos o células epiteliales, incluso si es fagocitado o absorbido de otro modo por tales células. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en diversas realizaciones de la presente invención incluyen polidioxanona (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poli(sebacato de glicerol), poliglicólido, poliláctido, PLGA, PLA, policaprolactona o copolímeros o derivados que incluyen estos y/u otros polímeros.

En ciertas realizaciones, los polímeros biocompatibles contemplados pueden ser biodegradables, es decir, el polímero puede ser degradado, química y/o biológicamente, dentro de un ambiente fisiológico, tal como dentro del cuerpo. Como es usado en la presente memoria, los polímeros "biodegradables" son aquellos que, cuando son introducidos en las células, son descompuestos mediante la maquinaria celular (biológicamente degradable) y/o por un proceso químico, tal como la hidrólisis, (químicamente degradable) en componentes que las células pueden reusar o eliminar sin efecto tóxico significativo en las células. En una realización, el polímero biodegradable y sus subproductos de degradación pueden ser biocompatibles.

Por ejemplo, un polímero contemplado puede ser uno que es hidrolizado espontáneamente tras la exposición al agua (por ejemplo, dentro de un individuo), el polímero puede ser degradado tras la exposición al calor (por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 37 °C). La degradación de un polímero puede ocurrir a velocidades variables, de acuerdo el polímero o copolímero usado. Por ejemplo, la vida media del polímero (el tiempo en el que el 50% del polímero puede ser degradado en monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, de acuerdo con el polímero. Los polímeros se pueden degradar biológicamente, por ejemplo, por actividad enzimática o maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, a través de la exposición a una lisozima (por ejemplo, que tiene un pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros pueden ser descompuestos en monómeros y/u otros restos no poliméricos que las células pueden reusar o eliminar sin un efecto tóxico significativo en las células (por ejemplo, el poliláctido se puede hidrolizar para formar ácido láctico, el poliglicólido se puede hidrolizar para formar ácido glicólico, etc).

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, que incluyen copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tal como ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico), ácido poli(láctico-co-glicólico), y poli(láctido-co-glicólido), colectivamente denominados en la presente memoria como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominadas en la presente memoria como "PGA," y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido, y poli-D,L-láctido, colectivamente denominados en la presente memoria como "PLA." En algunas realizaciones, los ejemplos de poliésteres incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos o polianhídridos.

En otras realizaciones, los poliésteres contemplados para usar en las nanopartículas desveladas pueden ser copolímeros dibloque, por ejemplo, polímeros y copolímeros PEGilados (que contienen unidades repetidas de poli(etilenglicol)) tales como de láctido y glicólido (por ejemplo, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado), poli(caprolactona) PEGilada y sus derivados. Por ejemplo, un polímero "PEGilado" puede ayudar en el control de la inflamación y/o inmunogenicidad (es decir, la capacidad de provocar una respuesta inmune) y/o disminuir la tasa de depuración del sistema circulatorio a través del sistema reticuloendotelial (RES), debido a la presencia de los grupos poli(etilenglicol).

La PEGilación también puede ser usada, en algunos casos, para disminuir la interacción de carga entre un polímero y un resto biológico, por ejemplo, mediante la creación de una capa hidrófila en la superficie del polímero, que puede proteger al polímero de la interacción con el resto biológico. En algunos casos, la adición de unidades repetidas de poli(etilenglicol) puede aumentar la vida media en plasma del polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque), por ejemplo, mediante la disminución de la captación del polímero por el sistema fagocítico mientras que disminuye la eficiencia de transfección/captación por las células. Los expertos en la técnica conocerán los procedimientos y técnicas para PEGilar un polímero, por ejemplo, mediante el uso de EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboxiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, mediante técnicas de polimerización de apertura de anillo (ROMP), o similares.

Otros polímeros contemplados que pueden formar parte de una nanopartícula desvelada pueden incluir poli(orto éster), poli(orto éster) PEGilado, polilisina, polilisina PEGilada, poli(etilenimina), poli(etilenimina) PEGilada, poli(L-láctido-co -

L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico] y sus derivados. En otras realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas. Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctido-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina).

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

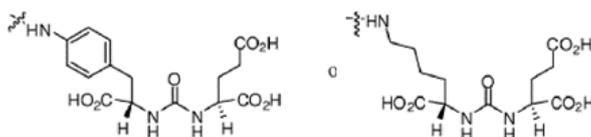
El PLGA contemplado para uso como es descrito en la presente memoria puede estar caracterizado por una relación de ácido láctico:ácido glicólico de, por ejemplo, 85:15, 75:25, 60:40, 50:50, 40:60, 25:75 o 15:85. En algunas realizaciones, la relación de monómeros de ácido láctico a ácido glicólico en el polímero de la partícula (por ejemplo, un copolímero en bloque PLGA o un copolímero en bloque de PLGA-PEG), puede ser seleccionada para optimizar para diversos parámetros tal como, se puede optimizar la absorción de agua, la liberación del agente terapéutico y/o la cinética de degradación del polímero. En otras realizaciones, el grupo final de una cadena polimérica de PLA puede ser un grupo ácido carboxílico, un grupo amina o un grupo final protegido con, por ejemplo, un grupo alquilo de cadena larga o colesterol.

20 Restos de localización

En la presente memoria son proporcionadas nanopartículas que pueden incluir un resto de localización opcional, es decir, un resto capaz de estar unido o asociado de otra forma con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana, un receptor de superficie celular, antígeno de membrana específico de próstata, o similares. Un resto de localización presente en la superficie de la partícula puede permitir que la partícula sea localizada en un sitio de localización particular, por ejemplo, un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. Como tal, la nanopartícula puede ser "específica de diana". El fármaco u otra carga útil, en algunos casos, posteriormente se puede liberar de la partícula y permitir que interactúe localmente con el sitio de localización particular.

Por ejemplo, una porción de localización puede hacer que las partículas sean localizadas en un tumor (por ejemplo, un tumor sólido), un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del cuerpo de un individuo, de acuerdo con el resto de localización usado. Por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede localizar en un tumor sólido, por ejemplo, tumores de mama o próstata o células cancerosas. El sujeto puede ser un animal humano o no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero sin limitación, un mamífero tal como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, un cobayo, un hámster, un primate, un ser humano o similares.

Por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular contemplado que, por ejemplo, se puede conjugar con un copolímero desvelado (y de este modo, en algunas realizaciones, formar parte de una nanopartícula desvelada) puede estar representado por



y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómero, o racematos.

40 Agentes terapéuticos

De acuerdo con la presente invención, cualquier agente que incluye, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes anticáncer), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agentes de contraste; radionúclidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo, vacunas) y/o los agentes nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.) pueden ser administrados mediante las nanopartículas desveladas. Los ejemplos de agentes que son administrados de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas (por ejemplo, agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ARNs, ARNi y microARN), proteínas (por ejemplo, anticuerpos), péptidos, lípidos, carbohidratos, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente que es administrado es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, pulmón o próstata).

- El agente o fármaco activo puede ser un agente terapéutico, tal como inhibidores de mTor (por ejemplo, sirolimus, temsirolimus o everolimus), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinorelbina o vincristina), un derivado de diterpeno, un taxano (por ejemplo, paclitaxel o sus derivados, tal como, DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel, o docetaxel), un éster de boronato o un compuesto de ácido borónico peptídico (por ejemplo, bortezomib), un agente cardiovascular (por ejemplo, un diurético, un vasodilatador, una enzima convertidora de angiotensina, un bloqueador beta, un antagonista de aldosterona o un diluyente de la sangre), un corticosteroide (por ejemplo, budenonida, fluciclonida, triamcinolona, mometasona, amcinonida, halcinonida, ciclesonida, beclometasona), un antimetabolito o agente antifolato (por ejemplo, metotrexato), un agente quimioterapéutico (por ejemplo, epotilona B), un agente de mostaza nitrogenada (por ejemplo, bendamustina), o el agente activo o fármaco puede ser un ARNsi.
- En un conjunto de realizaciones, la carga útil es un fármaco o una combinación de más de un fármaco. Dichas partículas pueden ser útiles, por ejemplo, en realizaciones en las que puede ser usado un resto de localización para dirigir una partícula que contiene un fármaco a una ubicación localizada particular dentro de un individuo, por ejemplo, para permitir que se produzca la administración localizada del fármaco. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina (adriamicina), gemcitabina (gemzar), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), alcaloides de la vinca tal como vinblastina, vinorelbina, vindesina o vincristina; bleomicina, taxanos tales como paclitaxel (taxol) o docetaxel (taxotere), inhibidores de mTOR tal como sirolimus, temsirolimus o everolimus, aldesleukina, asparaginasa, ésteres de boronato o compuestos de ácido borónico peptídico tal como bortezomib, busulfano, carboplatino, cladribina, camptotecina, CP-11, 10-hidroxi-7-etilcampotetina (SN38), dacarbazina, capecitabina SI, ftorafur, 5'desoxifluoruridina, UFT, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadeoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metilen-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxicamptitanciteca, karenitecina, 9-nitrocampotecina, TAS 103, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamida, mefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, bendamustina, epotilona A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, budesonida y sus combinaciones, o el agente terapéutico puede ser un ARNsi.

En algunas realizaciones, las nanopartículas contempladas no incluyen un taxano (por ejemplo, no incluyen docetaxel). En otras realizaciones, las nanopartículas contempladas no incluyen un alcaloide de la vinca o un inhibidor de mTOR.

- Los ejemplos no limitantes de fármacos potencialmente adecuados incluyen agentes anticáncer, que incluyen, por ejemplo, docetaxel, mitoxantrona y clorhidrato de mitoxantrona. En otra realización, la carga útil puede ser un fármaco anticáncer tal como 20-epi-I, 25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etiniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acilfiilvene, adecipenol, adozelesina, aldesleukina, antagonistas de all-tk, altretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametantrona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelide, anastrozol, androgradolide, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramincina, proteína morfogenética 1 anti-dorsalizdng, antiestrógeno, antineoplaston, oligonucleótidos antisentido, glicinato de afidicolina, moduladores del gen de apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico, ARA-CDP-DL-PTBA, arginina deaminasa, asparaginasa, asperlin, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azacitidina, azasetron, azatoxina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de baccatina III, balanol, batimastat, benzoclorinas, benzodepa, benzoilstaurosporina, derivados de beta lactama, beta-aletina, betaclamincina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, clorhidrato de bisantreno, bisazuidinilspermina, bisnafide, dimesilato de bisnafide, bistrateno A, bizelesina, bleomicina, sulfato de bleomicina, antagonistas de BRC/ABL, breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfani, butionina sulfoximina, cactinomicina, calcipotriol, calfofostina C, calusterona, derivados de camptotecina, IL-2 canarypox, capecitabina, caraceraide, carbetimer, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, earn 700, inhibidor derivado de cartílago, clorhidrato de carrubicina, carzelesina, inhiidores de caserina quinasa, castanospermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinóxalina sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, cisplatino, cis-porfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogos de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentantraquinonas, ciclofosfamida, ciclosporina, cicloplatam, cipemicina, citarabina, octofosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dacliximab, dactinomicina, clorhidrato de daunorubicina, decitabina, dehidrodidemina B, deslorelin, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diaziquona, didemina B, didox, dietilhiospermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetron, doxilfluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocannicina SA, ebselen, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemene, elsarnitruccina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, clorhidrato de epirubicina, epristeride, erbulozol, sistema del vector de terapia génica de eritrocitos, clorhidrato de esorubicina, estramustina, análogo de estramustina, fosfato de estramustina sódica, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, exemestano, fadrozol, clorhidrato de fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, floxuridina, fluasterona, fludarabina, fosfato de fludarabina, clorhidrato de fluorodaunorunicina, fluorouracilo, flucitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, fostriecin sódico, fotemustina, texafirina de gadolinio, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores

de glutation, hepsulfam, heregulina, hexameten bisacetamida, hidroxurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, ihnofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunoestimulantes, inhibidor del receptor del factor de crecimiento I tipo insulina, agonistas de interferón, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-NI, interferón alfa-N3, interferón beta-IA, interferón gamma-IB, interferones, interleuquinas, iobenguane, yododoxorrubicina, iproplatin, irinotecano, clorhidrato de irinotecano, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetron, jasplakinolide, kahalalide F, triacetato de lamellarina-N, lanreótida, acetato de lanreótida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinano, leptostatina, letrozol, factor inhibitorio de leucemia, alfa interferón de leucocitos, acetato de leuprolida, leuprolida/estrógeno/progesterona, leuprorelina, levamisol, liarozol, clorhidrato de liarozol, análogos de poliamina lineal, péptido de disacárido lipófilo, compuestos de platino lipófilos, lissoclinamida, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, clorhidrato de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecano, texafirina de lutecio, lisofilina, péptidos líticos, maytansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspin, inhibidores de matrilisina, inhibidores de la metaloproteinasas de la matriz, maytansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalan, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato de sodio, metoclopramida, metoprina, meturedapa, inhibidores de proteína quinasa C de microalgas, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN de cadena doble con error de apareamiento, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina, análogos de mitomicina, mitonafide, mitosper, mitotano, factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxina-saporina, mitoxantrona, clorhidrato de mitoxantrona, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, monofosforil lípido a/pared celular de micobacterias SK, mopidamol, inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia basada en supresor tumoral múltiple 1, agente anticáncer de mostaza, micaperóxido B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, n-acetildinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavin, nafterpin, nartograstim, nedaplatino, nemorrubicina, ácido neridrónico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores de óxido nítrico, antioxidante de nitróxido, nitrulina, nocodazol, nogalamicina, benzamidas n-substituidas, 06-benzilguanina, octeótido, okicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetron, oracina, inductor de citoquina oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisuran, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrhizoxina, ácido pamidrónico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, pentosan polisulfato de sodio, pentostatina, pentozol, sulfato de peplomicina, perflubron, perfosfamida, alcohol perilífico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanilo, clorhidrato de pilocarpina, pipobromano, pipsulfano, pirarrubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor del activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, propil bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma de próstata, inhibidores del proteasoma, inhibidores de proteasoma, inmunomodulador a base de proteína A, inhibidor de proteína quinasa C, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de purina nucleósido fosforilasa, puromicina, clorhidrato de puromicina, purpurinas, pirazorurina, pirazoloacridina, conjugado de hemoglobina piridoxilada y polioxi-etileno, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetron, inhibidores de RAS farnesil proteína transferasa, inhibidores de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina demetilada etidronato de renio RE 186, rizoxina, riboprina, ribozimas, RH retinamida, RNAi, rogetimida, rohitukina, romurtide, roquinimex, rubiginona BI, ruboxilo, safingol, clorhidrato de safingol, saintopina, sarcnu, sarcofitol A, sargramostim, miméticos de SD11, semustina, inhibidor 1 derivado de senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión a antígeno de cadena simple, sizofiran, sobuzoxano, borocaptato de sodio, fenilacetato de sodio, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, sparfosafe sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongiatrina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiámidas, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de estromelinas, sulfinosina, sulofenur, antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glicosaminoglicanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metioduro de tamoxifeno, tauromustina, tazaroteno, tecogalan de sodio, tegafur, telurapirilio, inhibidores de telomerasa, clorhidrato de teloxantrona, temoporfina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoietina, mimético de trombopoietina, timalfasina, agonista del receptor de timopoietina, timotrinan, hormona estimulante de tiroides, tiazofurina, tin etil etiopurpurina, tirapazamina, dicloruro de titanoceno, clorhidrato de topotecano, topsentina, torremifeno, citrato de torremifeno, factor de células madre totipotentes, inhibidores de la traducción, acetato de trestolona, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, fosfato de triciribina, trimetrexato, glucuronato de trimetrexato, triptorelina, tropisetron, clorhidrato de tubulozol, turosterida, inhibidores de tirosina quinasa, tirfostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, muestra de uracilo, uredepa, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de uroquinasa, vapreotida, variolina B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, sulfato o tartrato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, zinostatin estimalámero o clorhidrato de zorrubicina.

En una realización, un agente activo puede (o puede no estar) conjugado a, por ejemplo, un polímero hidrófobo divulgado que forma parte de una nanopartícula divulgada, por ejemplo, un agente activo puede estar conjugado (por ejemplo, unido covalentemente, por ejemplo, directamente o a través de un resto de enlace) a PLA o PGLA, o una porción de PLA o PLGA de un copolímero tal como PLA-PEG o PLGA-PEG.

Preparación de nanopartículas

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas son formadas mediante la provisión de una solución que comprende uno o más polímeros y el contacto de la solución con un no disolvente de polímero para producir la partícula. La solución puede ser miscible o inmisible con el no disolvente de polímero. Por ejemplo, un líquido miscible en agua tal como el acetonitrilo puede contener los polímeros, y las partículas son formadas cuando el acetonitrilo se pone en contacto con agua, un no disolvente de polímero, por ejemplo, mediante el vertido del acetonitrilo en el agua a una tasa controlada. El polímero contenido dentro de la solución, después del contacto no disolvente de polímero, posteriormente puede precipitar para formar partículas tales como nanopartículas. Se dice que dos líquidos son "inmiscibles" o no miscibles entre sí cuando uno no es soluble en el otro a un nivel de al menos 10% en peso a temperatura y presión ambiente. Típicamente, una solución orgánica (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano, dimetilsulfóxido, etc.) y un líquido acuoso (por ejemplo, agua o agua que contiene sales u otras especies disueltas, células o medios biológicos, etanol, etc.) son inmiscibles entre sí. Por ejemplo, la primera solución se puede verter en la segunda solución (a una tasa o velocidad adecuada). En algunos casos, pueden ser formadas partículas tal como nanopartículas a medida que la primera solución entra en contacto con el segundo líquido inmisible, por ejemplo, la precipitación del polímero después del contacto hace que el polímero forme nanopartículas mientras la primera solución se vierte en el segundo líquido, y en algunos casos, por ejemplo, cuando la tasa de introducción se controla cuidadosamente y se mantiene a una tasa relativamente lenta, pueden ser formadas nanopartículas. Los expertos en la técnica pueden optimizar fácilmente el control de tal formación de partículas usando solo experimentación de rutina.

En otra realización, es proporcionado un procedimiento de nanoemulsión, tal como el procedimiento representado en las Figuras 1 y 2. Por ejemplo, un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, un copolímero dibloque tal como PLA-PEG o PLGA-PEG) y un segundo polímero opcional (por ejemplo, (PL(G)A-PEG o PLA), con una solución orgánica para formar una primera fase orgánica. Dicha primera fase puede incluir aproximadamente 5 a aproximadamente 50% en peso de sólidos, por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 40% de sólidos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 30% de sólidos. La primera fase orgánica se puede combinar con una primera solución acuosa para formar una segunda fase. La solución orgánica puede incluir, por ejemplo, tolueno, metil etil cetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo, dimetilformamida, cloruro de metileno, diclorometano, cloroformo, acetona, alcohol bencílico, Tween 80, Span 80 o similares, y sus combinaciones. En una realización, la fase orgánica puede incluir alcohol bencílico, acetato de etilo y sus combinaciones. La segunda fase puede estar entre aproximadamente 1 y 50% en peso, por ejemplo, aproximadamente 5-40% en peso de sólidos. La solución acuosa puede ser agua, opcionalmente en combinación con uno o más de colato de sodio, acetato de etilo, acetato de polivinilo y alcohol bencílico.

Por ejemplo, la fase oleosa u orgánica puede usar un disolvente que solo es parcialmente miscible con el no disolvente (agua). Por lo tanto, cuando es mezclada en una relación suficientemente baja y/o cuando es usada agua presaturada con los disolventes orgánicos, la fase de aceite permanece líquida. La fase oleosa puede ser emulsionada en una solución acuosa y, como gotas líquidas, cizallada en nanopartículas usando, por ejemplo, sistemas de dispersión de alta energía, tal como homogenizadores o sonicadores. La porción acuosa de la emulsión, conocida de otro modo como la "fase acuosa", puede ser una solución de tensioactivo que consiste en colato de sodio y está presaturada con acetato de etilo y alcohol bencílico.

La emulsión de la segunda fase para formar una fase de emulsión se puede realizar en una o dos etapas de emulsión. Por ejemplo, se puede preparar una emulsión primaria y posteriormente emulsionar para formar una emulsión fina. La emulsión primaria se puede formar, por ejemplo, usando un mezclado simple, un homogenizador de alta presión, un sonicador de sonda, una barra de agitación o un homogenizador de estator y rotor. La emulsión primaria se puede formar en una emulsión fina mediante el uso, por ejemplo, de un sonicador de sonda o un homogenizador a alta presión, por ejemplo, usando 1, 2, 3 o más pasadas a través de un homogenizador. Por ejemplo, cuando es usado un homogenizador de alta presión, la presión usada puede ser de 6,9 a 55,1 MPa, 13,8 a 27,5 MPa, 27,5 a 55,1 MPa, o 27,5 a 34,5 MPa, por ejemplo, 13,8, 17,2, 27,5 o 34,5 MPa.

Puede ser necesaria la evaporación o dilución del disolvente para completar la extracción del disolvente y solidificar las partículas. Para un mejor control sobre la cinética de extracción y un proceso más escalable, puede ser usada una dilución con disolvente mediante inactivación acuosa. Por ejemplo, la emulsión puede ser diluida en agua fría a una concentración suficiente para disolver todo el disolvente orgánico para formar una fase inactivada. La inactivación se puede realizar al menos parcialmente a una temperatura de 5 °C o menos. Por ejemplo, el agua usada en la inactivación puede estar a una temperatura que es menor a la temperatura ambiente (por ejemplo, 0 a 10 °C, o 0 a 5 °C).

En algunas realizaciones, no todo el agente terapéutico (por ejemplo, docetaxel) es encapsulado 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 de sodio o colato de sodio. Por ejemplo, Tween-80 se puede añadir a la suspensión de nanopartículas inactivadas para solubilizar el fármaco libre y evitar la formación de cristales de fármaco. En algunas realizaciones, una relación de solubilizante de fármaco a agente terapéutico (por ejemplo, docetaxel) es 100:1 a 10:1.

La fase solubilizada puede ser filtrada para recuperar las nanopartículas. Por ejemplo, las membranas de ultrafiltración pueden ser usadas para concentrar la suspensión de nanopartículas y eliminar sustancialmente el disolvente orgánico, el fármaco libre y otros auxiliares de procesamiento (tensoactivos). La filtración ejemplar se puede realizar usando un sistema de filtración de flujo tangencial. Por ejemplo, mediante el uso de una membrana con un tamaño de poro adecuado para retener nanopartículas mientras se permite que pasen solutos, micelas y disolventes orgánicos, las nanopartículas se pueden separar selectivamente. Pueden ser usadas membranas ejemplares con límites de peso molecular de 300-500 kDa (~5-25 nm).

La diafiltración se puede realizar usando un enfoque de volumen constante, lo que significa que el diafiltrado (agua desionizada fría, por ejemplo, 0 a 5 °C, o 0 a 10 °C) puede ser añadido a la suspensión de alimentación a la misma velocidad que el filtrado es eliminado de la suspensión. En algunas realizaciones, el filtrado puede incluir un primer filtrado usando una primera temperatura de 0 a 5 °C, o de 0 a 10 °C, y una segunda temperatura de 20 a 30 °C, o de 15 a 35 °C. Por ejemplo, el filtrado puede incluir el procesamiento de 1 a 6 diavolumenes a 0 a 5 °C, y el procesamiento de al menos un diavolumen (por ejemplo, 1 a 3 o 1-2 diavolumenes) a 20 a 30 °C.

Después de purificar y concentrar la suspensión de nanopartículas, las partículas pueden pasar a través de uno, dos o más filtros de esterilización y/o profundidad, por ejemplo, usando un prefiltro de profundidad de ~0,2 µm.

En otra realización de preparación de nanopartículas, es formada una fase orgánica compuesta de una mezcla de un agente terapéutico, por ejemplo, docetaxel y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica es mezclada con una fase acuosa a una relación aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta de un tensoactivo y cierta cantidad de disolvente disuelto. La emulsión primaria se forma mediante la combinación de las dos fases bajo mezclado simple o mediante el uso de un homogenizador de estator y rotor. La emulsión primaria posteriormente es formada en una emulsión fina mediante el uso de un homogenizador de alta presión. La emulsión fina posteriormente es inactivada mediante la adición de agua desionizada bajo mezcla. La relación de inactivación:emulsión es aproximadamente 8,5:1. Posteriormente es añadida una solución de Tween (por ejemplo, Tween 80) a la inactivación para lograr aproximadamente 2% de Tween total. Esto sirve para disolver el fármaco sin encapsular, libre. Las nanopartículas son aisladas posteriormente mediante centrifugación o ultrafiltración/diafiltración.

Se apreciará que las cantidades de polímero y agente terapéutico o activo que usadas en la preparación de la formulación pueden diferir de una formulación final. Por ejemplo, algunos agentes activos pueden no ser incorporados completamente en una nanopartícula y dicho agente terapéutico libre, puede ser eliminado por ejemplo, por filtración.

Composiciones farmacéuticas

Las nanopartículas desveladas en la presente memoria pueden ser combinadas con portadores farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica. Como puede apreciar un experto en la técnica, los portadores pueden ser seleccionados sobre la base de la vía de administración como es descrito a continuación, la ubicación del tejido diana, el fármaco administrado, el curso de tiempo de administración del fármaco, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye las vías orales y parenterales. El término "paciente", como es usado en la presente memoria, se refiere tanto a seres humanos como a no humanos, que incluyen, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En ciertas realizaciones, las vías parenterales son deseables ya que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con tales realizaciones, las composiciones pueden ser administradas por inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), rectal, vaginal, tópica (como en polvos, cremas, ungüentos o gotas), o por inhalación (como por sprays).

Las nanopartículas de la presente divulgación pueden ser administradas a un individuo necesitado de dicho tratamiento de forma sistémica, por ejemplo, por vía parenteral, o mediante infusión o inyección IV.

En algunas realizaciones, es contemplada una composición adecuada para congelación, que incluye nanopartículas desveladas en la presente memoria y una solución adecuada para congelación, por ejemplo, una solución de sacarosa y/o sal es añadida a la suspensión de nanopartículas. La sacarosa puede actuar, por ejemplo, como un crioprotector para evitar que las partículas se agreguen después de su congelamiento. Por ejemplo, es proporcionada en la presente memoria una formulación de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas desveladas, sacarosa, un haluro iónico y agua; en la que las nanopartículas/sacarosa/agua es 3-30%/10-30%/50-90% (p/p/p) o 5-10%/10-15%/80-90% (p/p/p) Por ejemplo, dicha solución puede incluir nanopartículas como es desvelado en la presente memoria, 5% a 20% en peso de sacarosa y un haluro iónico tal como cloruro de sodio, en una concentración de aproximadamente 10-100 mM.

Composiciones y procedimientos de tratamiento

Las nanopartículas desveladas en la presente memoria pueden ser combinadas con portadores farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica. Como puede apreciar un experto en la técnica, los portadores

pueden ser seleccionados sobre la base de la vía de administración como es descrito a continuación, la ubicación del tejido diana, el medicamento que se administra, el curso de tiempo de administración del fármaco, etc.

Las composiciones farmacéuticas y partículas desveladas en la presente memoria pueden ser administradas a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye las vías oral y parenteral. El término "paciente", como es usado en la presente, se refiere tanto a seres humanos como a no humanos, que incluyen, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En ciertas realizaciones, las vías parenterales son deseables ya que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con tales realizaciones, las composiciones pueden ser administrados por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular, inyección intraperitoneal), rectal, vaginal, tópica (como en polvos, cremas, ungüentos o gotas), o por inhalación (como por sprays).

Las nanopartículas desveladas pueden ser administradas a un individuo necesitado de dicho tratamiento en forma sistémica, por ejemplo, mediante infusión o inyección IV.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden ser formuladas de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxica aceptable por vía parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se hallan el agua, solución de Ringer, U.S.P y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites estériles fijos se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, que incluyen mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tal como el ácido oleico son usados en la preparación de inyectables. En una realización, el conjugado de la invención se suspende en un fluido portador que comprende 1% (p/v) de carboximetilcelulosa sódica y 0,1% (v/v) de TWEEN™ 80. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o por incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Las formas de dosis sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosis sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado es mezclado con al menos un excipiente o portador inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o (a) agentes de carga o extensores tal como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa y acacia, (c) humectantes tal como glicerol, (d) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o mandioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, (e) agentes retardadores de la solución, tal como parafina, (f) aceleradores de la absorción, tal como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes tal como caolín y arcilla de bentonita, y (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y sus mezclas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosis también puede comprender agentes tamponantes.

Las nanopartículas desveladas pueden estar formuladas en forma de unidad de dosis para facilitar la administración y la uniformidad de dosis. La expresión "forma de unidad de dosis" como es usada en la presente memoria se refiere a una unidad de nanopartículas físicamente discreta apropiada para el paciente que va a ser tratado. Para cualquier nanopartícula, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, generalmente ratones, conejos, perros o cerdos. También puede ser usado un modelo animal para lograr un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Dicha información posteriormente puede ser usada para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. La eficacia terapéutica y la toxicidad de las nanopartículas puede ser determinada mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, la ED₅₀ (la dosis es terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y LD₅₀ (la dosis es letal para el 50% de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación, LD₅₀/ED₅₀. Las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden ser usados para formular un intervalo de dosificación para uso humano.

En algunas realizaciones, es contemplada una composición adecuada para congelación, que incluye las nanopartículas desveladas en la presente memoria y una solución adecuada para congelación, por ejemplo, una solución de azúcar (por ejemplo, sacarosa) es añadida a una suspensión de nanopartículas. La sacarosa, por ejemplo, puede actuar como un crioprotector para evitar que las partículas se agreguen después de su congelamiento. Por ejemplo, es proporcionada en la presente memoria una formulación de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas desveladas, sacarosa y agua; en la que, por ejemplo, las nanopartículas/sacarosa/agua están presentes en 5-10%/10-15%/80-90% (p/p/p).

En algunas realizaciones, las partículas terapéuticas desveladas en la presente memoria pueden ser usadas para tratar, aliviar, mejorar, disminuir, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de

uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. Por ejemplo, las partículas terapéuticas desveladas, que incluyen taxano, por ejemplo, docetaxel, pueden ser usadas para tratar cánceres tales como cáncer de mama, pulmón o próstata en un paciente necesitado de dicho tratamiento. Otros tipos de tumores y células cancerosas para tratar con partículas terapéuticas de la presente invención incluyen todos los tipos de tumores sólidos, tal como los que están asociados con los siguientes tipos de cáncer: pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), pancreático, colon, rectal, esofágico, próstata, mama, carcinoma de ovario, carcinoma renal, linfoma y melanoma. El tumor puede estar asociado con cánceres (es decir, ubicado en) la cavidad oral y la faringe, el sistema digestivo, el sistema respiratorio, los huesos y las articulaciones (por ejemplo, metástasis óseas), los tejidos blandos, la piel (por ejemplo, melanoma), las mama, el sistema genital, el sistema urinario, los ojos y las órbitas, el cerebro y el sistema nervioso (por ejemplo, glioma) o el sistema endocrino (por ejemplo, tiroides) y no es necesariamente el tumor primario. Los tejidos asociados con la cavidad oral incluyen, pero sin limitación, la lengua y los tejidos de la boca. El cáncer puede surgir en los tejidos del sistema digestivo, que incluye, por ejemplo, el esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, vesícula biliar y páncreas. Los cánceres del sistema respiratorio pueden afectar la laringe, los pulmones y los bronquios e incluyen, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Los tumores pueden surgir en el cuello uterino, cuerpo uterino, vulva, ovario, vagina, próstata, testículos y pene, que componen los sistemas genitales masculino y femenino, y la vejiga urinaria, riñón, pelvis renal y uréter, que comprenden el sistema urinario.

Los procedimientos para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de mama o de próstata) pueden comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de las partículas terapéuticas desveladas a un individuo necesitado de dicho tratamiento, en las cantidades y durante el tiempo que sea necesario para lograr el resultado deseado. En ciertas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es la cantidad efectiva para tratar, aliviar, mejorar, disminuir, retrasar el inicio, inhibir la progresión de, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de, por ejemplo, un cáncer en tratamiento

Las nanopartículas terapéuticas desveladas que incluyen epotilona, por ejemplo, epotilona B pueden ser usadas para tratar cánceres tal como cáncer de mama, próstata, colon, glioblastoma, leucemia linfoblástica aguda, osteosarcoma, linfoma no Hodgkin o cáncer de pulmón, tal como un cáncer de pulmón de células no pequeñas, en un paciente necesitado de dicho tratamiento.

Las nanopartículas terapéuticas desveladas que incluyen un corticosteroide tal como budesonida pueden ser usadas para tratar asma, osteoartritis, dermatitis y trastornos inflamatorios tal como la enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn (también es contemplado el tratamiento de cánceres tal como el cáncer de colon).

Tasa de liberación del fármaco

La presente invención se refiere a un procedimiento para predecir la tasa de liberación del fármaco a partir de nanopartículas mediante la medición de la temperatura de transición vítrea (T_g) de las nanopartículas cargadas con fármaco en suspensión (por ejemplo, acuosa). Por ejemplo, la medición en condiciones de suspensión puede ser necesaria para manipular la composición química y las propiedades físicas de la nanopartícula en el torrente sanguíneo después de la administración IV. Las formulaciones de nanopartículas también se pueden diseñar para exhibir las tasas de liberación de fármaco deseadas en base a la T_g de las nanopartículas.

La temperatura de transición vítrea (T_g) de las nanopartículas que portan fármaco en suspensión acuosa puede ser un indicador de las características de liberación del fármaco de la nanopartícula. La identificación de la T_g de la suspensión de nanopartículas permite su uso como un predictor de las propiedades de liberación del fármaco, permite el diseño racional de polímeros de nanopartículas y formulaciones de fármacos que poseen las tasas deseadas de liberación del fármaco, y además permite la detección rápida de formulaciones para identificar objetivos de alto valor para una investigación adicional.

La formación de nanopartículas usando un proceso de emulsión típicamente produce una dispersión sólida amorfa de fármaco en polímero. De acuerdo con su estructura química, el polímero puede cristalizar parcialmente; sin embargo, a menudo la falta de estereoregularidad de las unidades repetitivas a lo largo de la cadena del polímero hace que el polímero adopte un estado amorfo. Este estado vítreo rígido es similar al obtenido mediante el enfriamiento de fundido de polímero. La fase de fusión se caracteriza por propiedades similares al caucho. La transición al estado vítreo se acompaña con cambios en las propiedades del material polimérico, que incluyen dureza, módulo de Young y capacidad calorífica. Pueden ser usadas diversas técnicas que controlan los cambios en estas propiedades para determinar la temperatura (o intervalo de temperatura) durante el cual es producida esta transición de caucho a vidrio, conocida como la temperatura de transición vítrea (T_g). La T_g puede ser, por ejemplo, dependiente de la pureza del polímero. Por ejemplo, la presencia de moléculas pequeñas, tal como moléculas de fármacos o agentes activos, moléculas de disolvente o no disolvente (es decir, agua), en nanopartículas puede afectar la T_g del polímero, por ejemplo, una relación alta de la superficie a volumen de nanopartículas puede contribuir al contenido de agua de la fase polimérica. La T_g de las nanopartículas poliméricas en una suspensión acuosa puede ser claramente diferente de la de una mezcla mesoscópica de polímero-fármaco de la misma composición química o de las nanopartículas que portan fármaco en forma de polvo seco.

El fármaco dentro de las nanopartículas puede estar disperso en forma molecular o puede formar nanocristales de

dimensiones menores que las de la nanopartícula de polímero. En ambos casos, la liberación del fármaco basada en la difusión desde la nanopartícula depende de su transporte a través de la matriz polimérica y hacia la fase acuosa circundante. Como tal, la solubilidad intrínseca del fármaco en la matriz polimérica, su coeficiente de difusión, la longitud de la trayectoria de difusión, la viscosidad así como la temperatura de la matriz polimérica pueden ser factores en la tasa de liberación del fármaco desde las nanopartículas. Por ejemplo, después de la inyección intravenosa, las nanopartículas se pueden equilibrar rápidamente a la temperatura fisiológica (37 °C) y, por lo tanto, las propiedades del material de la matriz polimérica a esta temperatura pueden influir en la tasa de liberación del fármaco. La difusión del fármaco a través del polímero y su liberación desde la nanopartícula pueden ser más lentas si la matriz polimérica está en un estado vítreo rígido a 37 °C, y relativamente más rápida si la matriz polimérica está en un estado gomoso a esta temperatura. Es decir, en condiciones fisiológicas, las nanopartículas que poseen una T_g a 37 °C o menor pueden liberar el fármaco a una tasa más rápida que las que poseen una T_g por encima de 37 °C.

Por ejemplo, las nanopartículas que comprenden PLA-PEG y PLA de bajo peso molecular (por ejemplo, PLA de 6,5 kDa) tienen una T_g menor que las nanopartículas que comprenden PLA-PEG solo. La adición de PLA de alto peso molecular (por ejemplo, PLA de 75 kDa) a nanopartículas que contienen PLA-PEG eleva la T_g por encima de la de las nanopartículas que comprenden PLA-PEG solo. Al variar el tipo y la cantidad de homopolímero, tal como el PLA, en una composición de nanopartículas, se puede alterar la T_g , lo que posteriormente afecta directamente la tasa de liberación del fármaco desde las nanopartículas. De manera similar, la T_g de las nanopartículas que incluyen copolímeros dibloque (por ejemplo, PLA-PEG) solo es típicamente una función de la masa molar del bloque de formación del núcleo (por ejemplo, PLA). Las temperaturas de transición vítrea de los componentes poliméricos de las nanopartículas pueden ser usadas para seleccionar composiciones que imparten una variedad de características térmicas a las partículas y permiten la predicción de sus propiedades de liberación del fármaco.

La presente divulgación se refiere en parte a procedimientos para evaluación de sistemas de polímeros y fármacos para identificar combinaciones que tienen las características térmicas necesarias (temperaturas de transición vítrea) asociadas con un perfil de liberación de fármaco deseado. Mediante el examen de la T_g de una composición de nanopartículas dada, se puede predecir la tasa de liberación del fármaco de las nanopartículas. La detección basada en T_g , o T_b , la temperatura a la que comienza la transición vítrea de las nanopartículas, puede identificar rápidamente combinaciones de polímeros de nanopartículas que liberan el fármaco a una tasa deseada. En combinación con un medio de alto rendimiento de fabricación de nanopartículas, la presente divulgación permite la detección rápida de combinaciones de polímeros y fármacos para llegar a un número selecto de sistemas que posteriormente pueden ser sometidos a estudios tradicionales de liberación de fármacos más detallados.

Por ejemplo, el análisis de nanopartículas cargadas con fármaco por calorimetría diferencial de barrido, (DSC) en condiciones de suspensión acuosa demuestra la correlación entre la tasa de liberación del fármaco y la temperatura de transición vítrea de las nanopartículas. DSC es una técnica en la que el flujo térmico hacia una sustancia y una referencia es medida en función de la temperatura, mientras que la sustancia y la referencia se someten a un programa de temperatura controlada. Las técnicas DSC incluyen DSC de flujo térmico y DSC de compensación de potencia. En la DSC de flujo térmico, el instrumento consiste en una celda individual que contiene soportes de referencia y muestra separados por un puente que actúa como una fuga de calor. Este ensamblaje se halla dentro de un bloque de calentamiento u horno que es un cuerpo de temperatura constante. Las termocuplas en contacto térmico con las plataformas de muestra y referencia miden las temperaturas de la bandeja de muestra y la bandeja de referencia mientras la temperatura del bloque de calentamiento aumenta (ciclo de calentamiento) o disminuye (ciclo de enfriamiento) a una tasa dada, por ejemplo 10 °C/minuto. El resultado experimental consiste en el diferencial de temperatura (o diferencial de flujo térmico en Watio/gramo) entre las bandejas de muestra y referencia representadas frente a la temperatura del bloque de calentamiento. Por el contrario, en la DSC de compensación de potencia, el instrumento consiste en dos hornos separados pero idénticos, uno que aloja la muestra y el otro la referencia. En este caso, el diferencial de potencia necesario para mantener los dos hornos a temperatura constante sirve como base para el flujo térmico diferencial. El resultado experimental es análogo al de la DSC de flujo térmico.

Las temperaturas de transición vítrea de las nanopartículas en suspensión acuosa también pueden ser determinadas usando calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC). En esta técnica, una modulación de temperatura sinusoidal es superpuesta a una tasa de calentamiento o enfriamiento lineal. Esto se combina con un procedimiento matemático que separa el flujo térmico total (similar a lo observado en DSC convencional) en componentes de flujo térmico reversibles y no reversibles. El componente de flujo térmico reversible es derivado de la capacidad calorífica de la muestra, así como de los eventos que responden directamente a los cambios en la velocidad de la rampa y son revertidos en el momento y a la temperatura a la que son observados. En otras palabras, los eventos (por ejemplo, temperatura de transición vítrea) que son lo suficientemente rápidos como para ser revertidos en la escala de tiempo de la modulación de temperatura sinusoidal contribuyen a esta señal. Los eventos que no responden a los cambios en la tasa de rampa (por ejemplo, relajación entálpica a la temperatura de transición vítrea) son observados en el componente de flujo térmico no reversible. Mediante la separación de los componentes de flujo térmico reversible y no reversible del flujo térmico total, MDSC permite la separación de los eventos de transición vítrea de los eventos de relajación entálpica. Por lo tanto, a diferencia de la DSC convencional, con la MDSC es posible la determinación exacta de la temperatura de transición vítrea de las muestras que exhiben relajaciones entálpicas fuertes a la temperatura de transición vítrea. Por ejemplo, cuando las suspensiones de nanopartículas son analizadas usando la MDSC y el componente de flujo térmico reversible es representado frente a la temperatura de la muestra, las curvas pueden

parecer similares a las observadas en la DSC convencional (curvas de flujo térmico total versus temperatura de muestra), lo que confirma que las transiciones observadas por la DSC convencional son eventos de transición vítrea en lugar de relajaciones entálpicas.

- 5 La tasa de liberación del fármaco puede ser medida usando una técnica de disolución *in vitro* (es decir, suspensión y centrifugación). Las nanopartículas son suspendidas en un medio de liberación, tal como hidroxipropil PCD (Trapsol) en PBS. Después de un período de tiempo, la suspensión es centrifugada, y es extraída una muestra del medio de la parte superior de la suspensión centrifugada sin causar turbulencia para evitar resuspender el pellet de nanopartículas en el fondo del tubo de centrifuga. La muestra es analizada posteriormente por HPLC para determinar la cantidad de fármaco liberado de las nanopartículas.
- 10 En una realización, las nanopartículas pueden comprender de 0,2 a 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; 10 a 99 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(D,L-láctico)-bloque-poli(etilen)glicol o copolímero de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-bloque-poli(etilen)glicol; y 0 a 50 o 0 a 75 por ciento en peso de ácido poli(D,L-láctico) o ácido poli(láctico)-ácido co-poli(glicólico). En otra realización, la porción del ácido poli(D,L-láctico) del copolímero tiene un peso molecular promedio en número de 16 kDa, y la porción de poli(etilen)glicol del copolímero tiene un peso molecular promedio en número de 5 kDa.
- 15 En otra realización, la porción de ácido poli(D,L-láctico) del copolímero tiene un peso molecular promedio en número de 50 kDa, y la porción de poli(etilen)glicol del copolímero tiene un peso molecular promedio en número de 5 kDa. En una realización, el ácido poli(D,L-láctico) tiene un peso molecular promedio en número de 6,5 kDa. En otra realización, el ácido poli(D,L-láctico) tiene un peso molecular promedio en número de 75 kDa.
- 20 En la presente divulgación, la temperatura de transición vítreas puede oscilar en +/- 0,5 °C. La temperatura de transición vítrea puede ser medida mediante calorimetría diferencial de barrido de flujo térmico, calorimetría diferencial de barrido de compensación de potencia y/o DSC modulada.
- En una realización, las nanopartículas desveladas liberan menos de 50% del agente terapéutico como es determinado en una prueba de disolución *in vitro* en un punto de tiempo de 4 horas. En otra realización, las nanopartículas liberan entre 50 a 70% del agente terapéutico como es determinado en una prueba de disolución *in vitro* en un punto de tiempo de 4 horas.
- 25 En otra realización, las nanopartículas liberan entre 70 a 100% del agente terapéutico como es determinado en una prueba de disolución *in vitro* en un punto de tiempo de 4 horas.
- En otra realización, el procedimiento para determinar la tasa de liberación de fármaco de una composición de nanopartículas poliméricas terapéuticas además comprende confirmar la tasa de liberación de fármaco predicha de la al menos una segunda pluralidad de nanopartículas poliméricas usando una prueba de disolución *in vitro*.
- 30

El primer y/o segundo agente terapéutico puede ser un agente de taxano, tal como docetaxel.

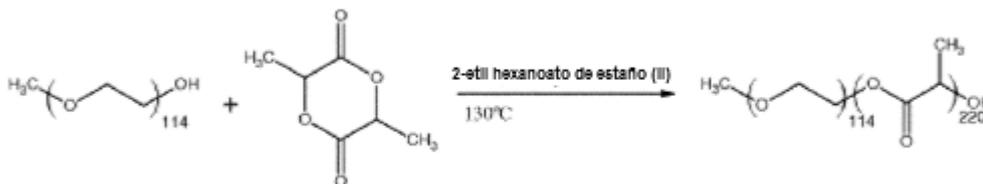
- En una realización, el primer y/o segundo copolímero en bloque puede comprender 0,2 a 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; 10 a 99 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(D,L-láctico)-b/ocfc-poli(etilen)glicol o copolímero de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-b/ocfc-poli(etilen)glicol; y 0 a 50 por ciento en peso de ácido poli(D,L-láctico) o ácido poli(láctico)-ácido co-poli(glicólico). En una realización, la porción de ácido poli(D,L-láctico) del primer y/o segundo copolímero en bloque puede tener un peso molecular promedio en número de 16 kDa o 50 kDa, y la porción de poli(etilen)glicol del primer y/o segundo copolímero en bloque puede tener un peso molecular promedio en peso de 5 kDa. En otra realización, el ácido poli(D,L-láctico) puede tener un peso molecular promedio en número de 8,5 kDa. En una realización, el ácido poli(D,L-láctico) puede tener un peso molecular promedio en número de 75 kDa.
- 35 En una realización, la porción de ácido poli(D,L-láctico) del primer y/o segundo copolímero en bloque puede tener un peso molecular promedio en número de 50 kDa, y la porción de poli(etilen)glicol del primer y/o segundo copolímero en bloque puede tener un peso molecular promedio en número de 5 kDa.
- 40

Ejemplos

- 45 La invención, que ahora es descrita de manera general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos que son incluidos meramente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitarla de ninguna manera.

Ejemplo 1: Preparación de PLA-PEG

- 50 La síntesis es lograda mediante la polimerización por apertura de anillo de d,l-láctido con α -hidroxi- ω -metoxipolietilenglicol) como macroiniciador, y es realizada a una temperatura elevada usando 2-etil hexanoato de estaño (II) como un catalizador, como se muestra a continuación (PEG $M_n \sim 5.000$ Da; PLA $M_n \sim 16.000$ Da; PEG-PLA $M_n \sim 21.000$ Da)



El polímero es purificado mediante la disolución en diclorometano y precipitación en una mezcla de hexano y dietil éter. El polímero recuperado de esta etapa es secado en un horno.

Ejemplo 2: Preparación de nanopartículas – Procedimiento de emulsión

5 Es formada una fase orgánica compuesta de una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y/o copolímero con ligando). La fase orgánica es mezclada con una fase acuosa a una relación aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta de un tensioactivo y cierta cantidad de disolvente disuelto. Para lograr una alta carga de fármaco, son usados aproximadamente 30% de sólidos en la fase orgánica.

10 La emulsión gruesa primaria es formada mediante la combinación de las dos fases en una mezcla simple (barra de agitación) o mediante el uso de un homogenizador de estator y rotor. La emulsión primaria es formada en una emulsión fina mediante el uso de un homogenizador de alta presión. Generalmente, son usados 1-3 pasajes a través de una cámara Z de 100 micrones a 62,05 MPa para producir una emulsión con el tamaño de partícula deseado.

15 La emulsión fina posteriormente se inactiva mediante la adición de agua desionizada a una temperatura dada bajo mezcla. En la operación de la unidad de inactivación, la emulsión es añadida a una inactivación acuosa fría bajo agitación. Esto sirve para extraer una porción significativa de los disolventes en fase oleosa, lo que endurece efectivamente las nanopartículas para la filtración corriente abajo. La relación de inactivación:emulsión es aproximadamente 5:1.

20 Es añadida una solución de 35% (% en peso) de Tween 80 a la inactivación para lograr aproximadamente 4% de Tween 80 total. Después de que la emulsión se inactiva, es añadida una solución de Tween-80 que actúa como un solubilizante del fármaco, lo que permite la eliminación efectiva del fármaco sin encapsular durante la filtración.

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

30 Las nanopartículas son aisladas posteriormente mediante un procedimiento de filtración de flujo tangencial para concentrar la suspensión de nanopartículas y el intercambio de tampón de los disolventes, el fármaco sin encapsular y el solubilizante del fármaco de la solución de inactivación en agua. Es usado una membrana de celulosa regenerada con un límite de peso molecular (MWCO) de 300. Es realizada una diafiltración de volumen constante (DF) para eliminar los disolventes de inactivación, el fármaco libre y Tween-80. Para realizar un DF de volumen constante, es añadido tampón al recipiente de fracción de retenida a la misma velocidad en la que es eliminado el filtrado.

35 La suspensión de nanopartículas filtradas es sometida posteriormente a un ciclo térmico a una temperatura elevada durante el desarrollo. Una pequeña porción (típicamente 5-10%) del fármaco encapsulado es liberada de las nanopartículas muy rápidamente después de su primera exposición a 25 °C. Debido a este fenómeno, los lotes que se mantienen fríos durante todo el desarrollo son susceptibles a que sean formados fármacos libres o cristales de fármacos durante la administración o cualquier porción de almacenamiento no congelado.

Después del procedimiento de filtración, la suspensión de nanopartículas es pasada a través de un filtro de grado de esterilización (0,2 μm absoluto). Los prefiltros son usados para proteger el filtro de grado de esterilización para usar un área/tiempo de filtración razonable para el proceso.

40 Los filtros usados normalmente son Pall SXMPDD 1404 (doble capa KS50P/EKSP, (0,1-0,3 μm Nominal); Pall Life Sciences Supor EKV 0,65/0,2 micrones filtro PES de grado de esterilización.

Pueden ser usados 0,2 m² de área de superficie de filtración por kg de nanopartículas para filtros de profundidad y 1,3 m de área de superficie de filtración por kg de nanopartículas para los filtros de grado de esterilización.

Ejemplo 3: Calorimetría diferencial de barrido de polímeros

45 Las temperaturas de transición vítrea de las nanopartículas y sus componentes poliméricos son medidas usando un TA Instruments Q200 o un TA Instruments Q2000 de DSC de flujo térmico equipado con la tecnología Tzero (T_0). La bandeja de muestra (que contiene 20-70 μL de suspensión de nanopartículas o 3-10 mg de polímero) y bandejas de

referencia (comprendidas de una bandeja de muestra vacía) son calentadas entre 4 °C y 70 °C a una tasa de rampa de 10 °C (o 20 °C) por minuto. Es usado nitrógeno seco de alta pureza para purgar el horno durante el análisis.

En la DSC de flujo térmico convencional, son usadas dos termocuplas, una para cada bandeja de muestra y de referencia. Cuando la temperatura del horno es elevada a una tasa de calentamiento constante (por ejemplo, 10 °C por minuto), la temperatura de la muestra (T_s) es rezagada con respecto a la temperatura de referencia (T_r) en un grado igual a la capacidad calorífica de la muestra, a condición de que las masas de la bandeja de muestra y referencia sean idénticas. La diferencia de temperatura, $\Delta T = T_s - T_r$, es registrada en función de la temperatura del bloque del horno. Típicamente, la salida del instrumento consiste en la tasa de flujo térmico por unidad de masa representada frente a la temperatura del bloque de calentamiento. La tasa de flujo térmico por unidad de masa en V_{atio}/g (eje y) consiste en $\Delta T/R$, en la que R es la resistencia térmica del puente de Constantan que conecta (y soporta) las bandejas de referencia y muestra. Por lo tanto, cuando es iniciado el experimento, la señal de DSC cambia de cero a un valor del estado estacionario ($T_s - T_r$)/R, lo que establece el valor de referencia experimental. Cuando es hallada una transición vítrea en un ciclo de calentamiento o en un ciclo de enfriamiento, el valor del estado estacionario cambia como resultado del aumento en la capacidad calorífica de la muestra por encima de la T_g de la muestra. Típicamente, la temperatura a la mitad de la altura de la capacidad calorífica cambia, $1/2 \Delta C_p$ es definida como la T_g de la muestra.

En la DSC de flujo térmico equipada con tecnología T_0 , una tercera termocupla mide la temperatura (T_0) del puente de Constantan que conecta (y soporta) las bandejas de referencia y muestra y la ecuación de flujo térmico consiste en tres términos adicionales, uno para explicar las diferentes resistencias de las celdas de muestra y referencia y uno para las diferencias en capacitancia térmica y tasas de calentamiento. Todos los datos de DSC presentados a continuación son obtenidos en instrumentos equipados con tecnología T_0 . Además, los datos son procesados usando el "modo T4", es decir, usando la ecuación de flujo térmico de cuatro términos. Para algunos experimentos, es usado el "modo T4P". En este modo, es utilizada una corrección para las diferencias entre los pesos de las bandejas de muestra y referencia además de los descritos para el modo T4.

Las muestras de polímeros sólidos, que incluyen poli(D, L-láctido)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-PEG, M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa), poli(D,L-láctido) (PLA, M_n = 6 kDa), y poli(D,L-láctido) (PLA, M_n = 75 kDa) son analizados usando bandejas herméticamente selladas, y las constantes del instrumento son determinadas usando el modo T4. Los resultados DSC obtenidos son mostrados en las Figuras 3 a 7, en las que la temperatura de transición vítrea es asignada usando el procedimiento del punto de inflexión (T_g = punto de mayor pendiente).

La Figura 3 muestra la curva DSC de poli(D,L-láctido)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-PEG, M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa) cuando es recuperado de una polimerización por fusión y ha sido enfriado a una tasa de enfriamiento desconocida. La medición de DSC es repetida. La curva superior es el primer calor, y la curva inferior es el segundo calor. Son observadas dos transiciones distintas en la curva de DSC del copolímero en bloque PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa). La transición entre 1 y 10 °C es una T_g de las fases mixtas de PEG y PLA, mientras que la transición entre 40 y 50 °C es un pico de fusión de una fase rica en PEG. El homopolímero de PEG de masas molares similares típicamente exhibe una T_g entre -50 y -25 °C, mientras que el homopolímero de PLA de masa molar similar exhibe una T_g en el intervalo de 30-50 °C. La T_g observada se halla entre la esperada para un homopolímero de PEG puro y un homopolímero de PLA puro, lo que indica que esta muestra de copolímero está compuesta por una fase mixta que contiene tanto PEG como PLA.

La Figura 4A muestra la curva DSC de poli(D,L-láctido)-bloque-poli(etilenglicol) (PLA-PEG, M_n bloque PLA = 16 kDa; M_n bloque PEG = 5 kDa) cuando es recuperado de una precipitación de la solución de polímero (100 mg/ml en diclorometano) en una mezcla binaria no disolvente (diel éter/hexano = 70/30 (v/v)). La medición de DSC es repetida. La curva superior es el primer calor y la curva inferior es el segundo calor. El copolímero en bloque exhibe una T_m entre 60 y 70 °C en el primer calor que indica la presencia de una fase de polímero de PEG cristalino. Después de enfriar, el polímero resultante es fundido a una tasa de 10 °C por minuto, la segunda curva de calentamiento exhibe una T_g de baja temperatura que indica una fase mixta única de PEG y PLA similar a la observada en la Figura 3 para el copolímero en bloque PLA-PEG recuperado de una fusión del polímero.

Los resultados que se muestran en las Figuras 3 y 4A sugieren que el número y el tipo de transiciones vítreas observadas en los sistemas de copolímeros en bloque, así como los valores de la T_g observada, oscilan ampliamente de acuerdo con el historial de la muestra. La vía experimental a la muestra de polímero (fusión frente a precipitación) altera su comportamiento de fase, lo que lleva a un comportamiento distinto de transición vítrea. El historial térmico (tal como la tasa de enfriamiento después de un ciclo de fusión) también altera significativamente la estructura de fase y el comportamiento térmico.

La Figura 4B muestra las curvas de DSC de cuatro copolímeros de PLA-PEG en las que el bloque de PEG consiste en un peso molecular promedio en número de 5 kDa y el peso molecular promedio en número de bloque PLA es 10, 15, 30 y 50 kDa, respectivamente. Como se observó anteriormente, el calentamiento de una muestra de polímero por encima de su T_g (y/o T_m , si corresponde) borra los efectos del historial térmico y permite la comparación directa de muestras que ahora tienen un historial térmico similar (es decir, han sido enfriados de una fusión a una tasa de enfriamiento fija, por ejemplo, 10 °C/minuto). Por lo tanto, solo se muestran los datos del segundo calor para cada sistema en la Figura 4B y la posición del punto de inflexión (valor T_g) de las fases mixtas de PLA y PEG aumenta de -6 °C a 33 °C a medida que aumenta el peso molecular promedio en número de PLA de 10 a 50 kDa. La Figura 4C

muestra la tendencia observada dentro del intervalo de peso molecular analizado e indica una fuerte dependencia de la T_g del peso molecular del polímero.

5 La Figura 5 muestra la curva DSC de poli(D, L-láctido) (PLA, $M_n = 6$ kDa) cuando es recuperado de un proceso de precipitación. La medición de DSC es repetida. La curva superior es el primer calor, y la curva inferior es el segundo calor. La Figura 5 muestra una transición vítrea entre 30 y 35 °C tanto en el primer como en el segundo ciclo de calor. Como era previsto para los homopolímeros, no se observa diferencia en la T_g a pesar de las diferentes vías (precipitación versus fusión) a la muestra de polímero debido a que no es posible la separación de fases.

10 La Figura 6A muestra la transición vítrea entre 45 y 50 °C observada en poli(D, L-láctido) (PLA, $M_n = 75$ kDa). La medición de DSC es repetida. La curva superior es el primer calor, y la curva inferior es el segundo calor. El valor de T_g más alto de esta muestra de PLA, con respecto al PLA de menor masa molar que se muestra en la Figura 5, indica el aumento esperado de T_g con el aumento del peso molecular del polímero. El primer ciclo de calor en la Figura 6A muestra un pico de histéresis endotérmica en el lado de alta temperatura de la transición vítrea, lo que indica que esta muestra de polímero es templada por debajo de su T_g o es enfriada (a partir de una fusión) a una tasa menor a 10 °C por minuto (la tasa de calentamiento usada en este ciclo de calor)

15 La determinación exacta de los valores de T_g es difícil cuando son producidos eventos de relajación entálpica cerca de la temperatura de transición vítrea como es observado para la muestra de PLA de 75 kDa que se muestra en la Figura 6A. La Figura 6B muestra el componente de calor reversible del flujo térmico total medido en experimentos de DSC modulada para varios homopolímeros de PLA. Los pesos moleculares promedio en número de las muestras de PLA analizadas oscila entre 2 K y 120 kDa. Los datos indican que los valores de T_g aumentan con el peso molecular en el intervalo de peso molecular de 2K Da a 22 kDa y posteriormente se amesetan después de un aumento adicional en el peso molecular como se muestra en la Figura 6C.

Ejemplo 4: Preparación de emulsión de nanopartículas que contienen fármaco

25 A continuación es sintetizado un procedimiento de emulsión general para la preparación de nanopartículas cargadas con fármaco en suspensión acuosa (en 30% en peso de sacarosa, 3 - 6% en peso de nanopartículas poliméricas que contienen aproximadamente 10% en peso de fármaco con respecto al peso de partícula). Es formada una fase orgánica compuesta de 30% de sólidos (% en peso) que incluye 24% de polímero y 6% de docetaxel (DTXL). Los disolventes orgánicos son acetato de etilo (EA) y alcohol bencílico (BA), en los que BA comprende 21% (% en peso) de la fase orgánica. La fase orgánica es mezclada con una fase acuosa a una relación aproximadamente 1:2 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta por 0,5% de colato de sodio, 2% de BA y 4% de EA (% en peso) en agua. La emulsión primaria es formada mediante la combinación de las dos fases bajo mezcla simple o mediante el uso de un homogenizador de estator y rotor. La emulsión primaria es formada en una emulsión fina mediante el uso de un homogenizador de alta presión. La emulsión fina es inactivada posteriormente mediante la adición a una inactivación por enfriamiento (0-5 °C) de agua desionizada bajo mezcla. La relación de inactivación:emulsión es aproximadamente 10:1. Después, es añadida una solución de 35% (% en peso) de Tween-80 a la inactivación para lograr aproximadamente 4% de Tween-80 total. Las nanopartículas son aisladas y concentradas a través de ultrafiltración/diafiltración.

40 En un ejemplo de procedimiento para preparación de nanopartículas de liberación rápida con T_g suprimida, 50% del polímero es copolímero dibloque de poliláctido-poli(etilenglicol) (PLA-PEG; 16 kDa-5 kDa) mientras que 50% del polímero es poli(D,L-láctido) (PLA; M_n 6,5kDa). Las nanopartículas resultantes tienen un inicio de la transición vítrea por debajo de 37 °C y, por lo tanto, una liberación relativamente rápida basada en difusión a temperatura fisiológica.

En un ejemplo de procedimiento para preparación de nanopartículas de liberación normal con T_g aumentada, 100% del polímero es copolímero dibloque de poliláctido-poli(etilenglicol) (PLA-PEG; 16 kDa-5 kDa). Las nanopartículas resultantes tienen un inicio de T_g a aproximadamente 37 °C.

45 En un ejemplo de procedimiento para preparación de nanopartículas de liberación lenta con T_g aumentada, 50% del polímero es copolímero dibloque de poliláctido-poli(etilenglicol) (PLA-PEG; 16 kDa-5 kDa) mientras que 50% del polímero es poli(D, L-láctido) (PLA; 75 kDa). Las nanopartículas resultantes tienen un inicio de T_g por encima de 37 °C y, por lo tanto, una liberación basada en difusión relativamente lenta a temperatura fisiológica.

Ejemplo 5: Procedimientos para determinar el tamaño de nanopartículas y el contenido de fármaco

50 El tamaño de partícula es analizado mediante dos técnicas - dispersión dinámica de luz (DLS) y difracción láser (LD). La DLS es realizada usando un instrumento Brookhaven ZetaPals a 25 °C en suspensión acuosa diluida usando un láser de 660 nm dispersado a 90° y analizado usando los procedimientos Cumulants (típico) y NNLS. La difracción láser es realizada con un instrumento Horiba LS950 en suspensión acuosa diluida usando un láser HeNe a 633 nm y un LED a 405 nm, dispersos a 90°, o un Accusizer SPOS, y analizados usando el modelo óptico Mie.

55 La carga de fármaco es calculada mediante la división del contenido de docetaxel de la suspensión de nanopartículas por el contenido de sólidos total de la suspensión. El contenido de docetaxel es determinado mediante la extracción del fármaco de las nanopartículas usando acetonitrilo y el análisis de las muestras en una columna de fase inversa C8 (Waters X-Bridge C8) usando un gradiente de acetonitrilo 20% (TFA 0,016%) a acetonitrilo 100% (TFA 0,016%). La

absorbancia del eluyente es controlada a 230 nm. Docetaxel eluyó con aproximadamente 40% de acetonitrilo. El gradiente es aumentado a 100% de acetonitrilo para eludir los componentes poliméricos de nanopartículas hidrófobas, PLA-PEG y PLA-PEG-GL2. El límite de cuantificación de docetaxel es de aproximadamente 0,5 µg/ml. El contenido de sólidos de la suspensión es determinado gravimétricamente mediante la eliminación de agua de la suspensión usando vacío y calor.

El tamaño de partícula y la carga del fármaco de los lotes de liberación lenta, normal y rápida descritos en el Ejemplo 4 son sintetizados en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5. Tamaño de nanopartícula y contenido de fármaco de nanopartículas cargadas con doxetacel

Descripción	Diámetro por DLS	Mediana por LD	Carga de fármaco
Liberación "rápida"	120,1 nm	No determinado	9,7%
Liberación "normal"	103,2 nm	77,6 nm	9,6%
Liberación "lenta"	99,7 nm	73,8 nm	8,0%

10 **Ejemplo 6: Determinación de T_g para nanopartículas en suspensión acuosa**

La temperatura de transición vítrea (T_g) de las nanopartículas en suspensión acuosa es determinada usando DSC de flujo térmico. Las muestras son calentadas entre 4 °C y 70 °C a una tasa de calentamiento constante de 10 °C por minuto o 20 °C por minuto. Debido a la presión de vapor de agua relativamente alta en la mayoría de este intervalo de temperatura, el análisis es realizada en bandejas herméticamente selladas para evitar fugas de vapor de agua.

15 Las Figuras 8 a 11 muestran las curvas de DSC de muestras de nanopartículas en una suspensión acuosa. Las muestras de nanopartículas analizadas son almacenadas típicamente congeladas a -20 °C. Las muestras almacenadas son descongeladas en primer lugar mediante su colocación en un baño de agua a temperatura ambiente y después son concentradas usando un procedimiento de ultracentrifugación. Son colocados aproximadamente 4 ml de suspensión de nanopartículas (nanopartículas de 30 - 50 mg/ml) en un dispositivo de filtración centrífugo Millipore
20 Amicon con carcasa de polipropileno y un filtro de membrana de celulosa regenerada con un límite de peso molecular de 100 kDa. La muestra es concentrada por centrifugación a 4000 x g durante 1 hora para reducir el volumen de la fracción retenida de tres a cuatro veces. La fracción retenida (ahora aproximadamente 120-150 mg/ml de nanopartículas) es transferida a un vial de centelleo de vidrio y congelada al ser colocada en un congelador a -20 °C. Este tratamiento térmico es idéntico al usado después de la fabricación de nanopartículas e incluyó temperaturas por
25 debajo de la temperatura de transición vítrea de las nanopartículas. Por lo tanto, este tratamiento no alteró el historial térmico de las partículas en relación con su condición después del procedimiento de fabricación de nanopartículas.

Las transiciones endotérmicas que se muestran en las figuras 8 a 11 son definidas mediante la selección de cinco puntos para identificar la temperatura de transición vítrea como se muestra en la Figura 7. Estas incluyen una T_b , el comienzo de la desviación de la curva DSC de la linealidad; T_1 la temperatura de inicio extrapolada de la transición
30 vítrea; T_2 , la temperatura final extrapolada de la transición vítrea; y T_e , la temperatura final de la transición vítrea. La temperatura de transición vítrea se define de una de dos formas posibles: como la temperatura a la mitad de la altura del aumento de la capacidad calorífica ($1/2 \Delta C_p$) (como se muestra en la Figura 7) o como el punto de inflexión.

Las curvas de DSC en la Figura 8 muestran la transición endotérmica exhibida por una suspensión de nanopartículas en la que las partículas están hechas de una mezcla 50/50 (en peso) de copolímero PLA-PEG (16 kDa-5 kDa) y homopolímero de PLA de bajo peso molecular ($M_n = 6,5$ kDa) cuando es calentada entre 4 °C y 70 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto. La muestra de nanopartículas analizada contiene aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. El análisis es realizado usando un TA Instrument Q200 DSC de flujo térmico. La medición de DSC es repetida. Los valores de T_b y T_g observados están a 37 °C y 39,7 °C, respectivamente para el primer ciclo de calor (curva superior). La muestra es enfriada posteriormente a una tasa de 10 °C por minuto a 4 °C y calentada
35 nuevamente a 70 °C (a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto) en un segundo ciclo de calentamiento. La curva inferior de la Figura 8 muestra la transición endotérmica observada en el segundo ciclo de calor. Los valores de T_b y T_g ahora cambian a 33 °C y 36,7 °C, respectivamente. En el uso para inyección intravenosa, las nanopartículas solo estarían expuestas a temperatura fisiológica. Por lo tanto, solo los datos en el primer ciclo de calor son relevantes al predecir su comportamiento de liberación de fármaco.

45 Las curvas de DSC en la Figura 9 muestran la transición endotérmica exhibida por una suspensión de nanopartículas en la que las partículas están hechas de copolímero PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) como el único componente polimérico en la formulación. La suspensión es calentada entre 4 °C y 70 °C a una tasa de calentamiento de 20 °C por minuto. La muestra de nanopartículas analizada contiene aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. El análisis es realizado usando un TA Instrument Q200 DSC de flujo térmico. La medición de DSC es repetida. Los
50 valores de T_b y T_g observados están a 37,3 °C y 41,3 °C, respectivamente, para el primer ciclo de calor que se muestra como la curva superior en la Figura 9. La curva inferior muestra una ejecución duplicada de una muestra fresca de

suspensión de nanopartículas, y da como resultado valores de T_b y T_g de 37,5 °C y 39,8 °C, respectivamente.

5 Las curvas de DSC en la Figura 10 muestran la transición endotérmica exhibida por una suspensión de nanopartículas en la que las partículas están preparadas a partir de una mezcla 50/50 (en peso) de copolímero PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y homopolímero de PLA de alto peso molecular ($M_n = 75$ kDa) cuando es calentada entre 4 °C y 70 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto. La muestra de nanopartículas analizada contiene aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. El análisis es realizado usando un TA Instrument Q200 DSC de flujo térmico. La medición de DSC es repetida. Los valores de T_b y T_g observados están a 43 °C y 44,9 °C, respectivamente, para el primer ciclo de calor (curva superior). La muestra es enfriada posteriormente a una tasa de 10 °C por minuto a 4 °C y es calentada nuevamente a 70 °C (a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto) en un segundo ciclo de calentamiento. La curva inferior que se muestra en la Figura 10 muestra la transición endotérmica observada en el segundo ciclo de calor. Los valores de T_b y T_g cambiaron a 39 °C y 41 °C, respectivamente.

15 Las curvas de DSC en la Figura 11A muestran la transición endotérmica exhibida por una suspensión de nanopartículas en la que las partículas están preparadas a partir de una mezcla 50/50 (en peso) de copolímero PLA-PEG (16kDa-5kDa) y homopolímero PLA de alto peso molecular ($M_n = 75$ kDa) cuando es calentada entre 4 °C y 70 °C a una tasa de calentamiento de 20 °C por minuto. La muestra de nanopartículas analizada contiene aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. El análisis es realizado usando un TA Instrument Q200 DSC de flujo térmico. La medición de DSC es repetida. Los valores de T_b y T_g observados están a 44 °C y 45,3 °C, respectivamente, para el primer ciclo de calor. La curva inferior muestra una ejecución duplicada de una muestra fresca de suspensión de nanopartículas, y da valores de T_b y T_g de 42,4 °C y 43,8 °C, respectivamente.

20 La Tabla 6A sintetiza las transiciones endotérmicas observadas en los estudios de DSC en las nanopartículas desveladas anteriormente.

Tabla 6A: Síntesis de las transiciones endotérmicas observadas en el primer ciclo de calor de las suspensiones de nanopartículas

Figura	Descripción	Instrumento usado y modo	Tasa de calentamiento °C/min.	T _b (°C)	T _g (°C)	T _e (°C)
Fig. 8	PLA-PEG y 6,5kDa PLA	TA Q200 -T4	10	31*	39,7	42,5
Fig. 9	PLA-PEG solo	TA Q2000 -T4P	20	37,3	41,3	45,3
Fig. 10	PLA-PEG y 75kDa PLA	TA Q200 -T4	10	43	44,9	46,3
Fig. 11	PLA-PEG y 75kDa PLA	TAQ2000 -T4P	20	44	45,3	46,5

* En todos los casos, los valores de T_b, T_g y T_e corresponden a las barras transversales en las curvas de DSC con la excepción de la Figura 8, en la que la desviación del valor de referencia comienza a 32 °C. Debido a otra etapa vista a aproximadamente 34 °C, las barras transversales no reflejan el valor de T_b exactamente. Por lo tanto, es asignado un valor de T_b de 35 °C para dar cuenta de la desviación.

5 Para confirmar las temperaturas de transición vítrea de las nanopartículas que contienen docetaxel, es sometido a prueba un lote diferente de partículas de la composición de muestra como las mostradas en las Figuras 8 a 11 (y la Tabla 6A) usando DSC modulada (MDSC). Los procedimientos de preparación de muestras de nanopartículas usados son iguales a los descritos anteriormente. El experimento de DSC modulada es llevado a cabo usando una oscilación de temperatura sinusoidal de amplitud 0,5 °C y un período de 60 segundos superpuesto a una tasa de rampa lineal de 2 °C/minuto. La Figura 11B muestra el componente de flujo térmico reversible del flujo térmico total. Estos lotes de nanopartículas también mostraron una dependencia similar de la temperatura de transición vítrea de nanopartículas con respecto a la composición de nanopartículas como se observa en las Figuras 8 a 11.

15 En la Figura 11B, la curva superior de M-DSC muestra una T_g a 37,8 °C exhibida por nanopartículas (Muestra A) en la que las partículas están preparadas a partir de una mezcla 50/50 (en peso) de copolímero de PLA-PEG (16 kDa -5 kDa) y homopolímero de PLA de bajo peso molecular (M_n = 6,5 kDa) y contienen aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. La segunda curva de M-DSC muestra una T_g a 40,1 °C exhibida por nanopartículas (Muestra B) en la que las partículas están preparadas a partir de copolímero PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) como el único componente polimérico en la formulación y contienen aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. La tercera curva de M-DSC muestra una T_g a 43,0 °C exhibida por nanopartículas (Muestra C) en la que las partículas están preparadas a partir de una mezcla 50/50 (en peso) de copolímero de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y homopolímero de PLA de alto peso molecular (M_n = 75 kDa) y contiene aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado. La curva M-DSC inferior muestra una T_g a 37,3 °C exhibida por nanopartículas (Muestra D) en la que las partículas están preparadas a partir de copolímero PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) como el único componente polimérico y no contienen docetaxel encapsulado.

25 La Tabla 6B sintetiza las transiciones vítreas endotérmicas observadas en el estudio de DSC modulada de las nanopartículas desveladas anteriormente.

Tabla 6B: Síntesis de las transiciones de vidrio observadas en el análisis de DSC modulada de suspensiones de nanopartículas

Figura	Descripción	Fármaco encapsulado	Instrumento usado y modo	T _g (°C)
Fig. 11 B Muestra A	PLA-PEG y PLA6,5 kDa	Docetaxel	TA Q2000 - T4P	37,8
Fig. 11 B Muestra B	PLA-PEG solo	Docetaxel	TA Q2000-T4P	40,1
Fig. 11 B Muestra C	PLA-PEG y PLA 75 kDa	Docetaxel	TA Q2000-T4P	43,0
Fig. 11 C Muestra D	PLA-PEG y PLA 75 kDa	Ninguno	TAQ2000-T4P	37,3

Ejemplo 7: Tasa de liberación de fármaco de las muestras de nanopartículas

5 La tasa del fármaco liberado de las nanopartículas es determinada *in vitro* en condiciones de hundimiento con respecto a la solubilidad del fármaco (docetaxel) en agua. El experimento es realizado a pH fisiológico y fuerza iónica usando una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene hidroxipropil-p-ciclodextrina (HP-βCD) como un solubilizante del fármaco como medio de liberación.

10 Las muestras de nanopartículas cargadas con docetaxel que contienen aproximadamente 5 mg/ml de fármaco son diluidas en primer lugar con agua desionizada hasta una concentración final de 250 mg/ml (en docetaxel). Por ejemplo, un lote que contiene 1 ml de DTXL 5 mg/ml es diluido con 19 ml de agua DI fría para dar un total de 20 ml de suspensión de nanopartículas que contiene 250 µg/ml de fármaco.

15 El medio de liberación (2,5% HP-βCD en PBS (p/p)) es preparado mediante la disolución de PBS (Sigma PBS P-5368) en agua desionizada para obtener una solución tampón de fosfato que contiene solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (NaCl:0,138 M; KCl:0,0027 M). Son disueltos 100 mg de hidroxipropil βCD (T_{apsol}), en 3900 g de solución de PBS para obtener HP-βCD 2,5% en PBS. Son transferidos 120 ml de este medio de liberación a botellas Qorpak de boca ancha (16194-290 VWR#, 7983 Qorpak#) usando un cilindro graduado.

20 La suspensión de nanopartículas (3 ml) es añadida a 120 ml de medio de liberación en la botella Qorpak. La botella es tapada y mezclada mediante agitación a mano. Son retiradas muestras de control de tiempo cero (T = 0). Las primeras muestras no centrifugadas son obtenidas mediante la extracción de 900 µL de muestra inmediatamente después de mezclar la suspensión de nanopartículas con el medio de liberación y transferirla a un vial de HPLC que contenía un volumen igual (900 µL) de acetonitrilo. Es obtenida una muestra centrifugada (segunda muestra), que es sometida a un tratamiento de centrifugación análogo al recibido por muestras extraídas en puntos de tiempos posteriores mediante la extracción de una muestra de 4 ml de la botella Qorpak y transferencia a un tubo de centrifuga (Beckman coulter, Capacidad 4 ml, #355645). La muestra es centrifugada posteriormente a 50.000 rpm (236.000 g) durante 1 hora a 4 °C en un Ultracentrifuge Optima MAX-XP (P/N 393552AB, TZ08H04, Cat# 393315) usando un rotor de ángulo fijo MLA 55 (S/N 08U411). Son extraídos 900 µL de sobrenadante de la parte superior de las muestras centrifugadas sin causar turbulencia para evitar resuspender el pellet de nanopartículas en el fondo del tubo de centrifuga. Esta alícuota de 900 µL es transferida a 900 µL de acetonitrilo en un vial de HPLC. El docetaxel hallado en el sobrenadante representa la cantidad de fármaco liberado, dado que cualquier fármaco aún encapsulado dentro de las nanopartículas es granulado (con las nanopartículas) después de la centrifugación.

35 Las muestras de liberación en las botellas Qorpac son agitadas continuamente a 75 rpm usando un agitador de baño de agua mantenido a 37 °C para mantener condiciones de mezcla continua. Son extraídas muestras de 4 ml en puntos de tiempo predeterminados y tratadas como es descrito anteriormente para obtener muestras de HPLC para el análisis del contenido de docetaxel. Las muestras son extraídas típicamente a las 0, 1, 2, 4 y 24 horas, y los puntos de tiempo son modificados según sea necesario para dar cuenta de lotes de liberación significativamente más rápidos o más lentos.

40 La Figura 12 muestra la tasa de liberación de docetaxel (como porcentaje de docetaxel encapsulado total) a 37 +/- 0,5 °C a partir de nanopartículas compuestas de diferentes materiales poliméricos. La línea continua (superior) corresponde a la tasa de liberación del fármaco desde un sistema de liberación "rápido" compuesto por una mezcla 1:1 (p/p) de PLA-PEG (16 kDa-5 kDa) y homopolímero de PLA de bajo peso molecular (M_n = 6,5 kDa). La línea

discontinua (mitad) corresponde a la tasa de liberación del fármaco de un sistema de liberación "normal o intermedio" compuesto solo por PLA-PEG (16 kDa-5 kDa). La línea de puntos (inferior) corresponde a la tasa de liberación del fármaco de un sistema de liberación "lento" compuesto por una mezcla 1:1 (p/p) de PLA-PEG (16 kDa-5 kDa) y homopolímero de PLA de alto peso molecular ($M_n = 75$ kDa).

5 La tasa de docetaxel liberado de las nanopartículas a 37 °C como se muestra en la Figura 12 indica una fuerte dependencia de la composición de nanopartículas. Las nanopartículas obtenidas de una mezcla de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y PLA ($M_n = 6,5$ kDa) exhibieron un perfil de liberación "rápida" con aproximadamente 75% del fármaco encapsulado liberado dentro de las primeras 4 horas de exposición al medio de liberación. Por el contrario, cuando las nanopartículas estaban preparadas solo a partir de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa), fue liberado aproximadamente 65% del fármaco encapsulado durante un período similar. Este efecto es amplificado adicionalmente cuando las nanopartículas son preparadas a partir de una mezcla de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y PLA de alto peso molecular ($M_n = 75$ kDa). En este sistema, solo aproximadamente 50% del fármaco fue liberado en las primeras 4 horas.

10 Como es observado en la Tabla 7A, las transiciones vítreas endotérmicas observadas en los tres sistemas de nanopartículas indican que la temperatura correspondiente al punto en el que la curva DSC comienza a desviarse de la linealidad (T_b) es un parámetro clave para determinar la tasa de liberación del fármaco de las partículas. En el sistema de liberación "rápida", la transición endotérmica comienza a 35 °C. El comportamiento de liberación observado en este sistema indica que el inicio del movimiento segmentario y el consiguiente aumento de la tasa de difusión del fármaco dentro del núcleo de las nanopartículas permite que el fármaco llegue a la interfaz de partículas-agua a una tasa mayor que la observada en sistemas en los que $T_b > 37$ °C. El sistema de liberación "normal" exhibe una $T_b = 37,3$ °C, y la tasa de liberación del fármaco es correspondientemente más lenta. El sistema de liberación "lento" exhibe de manera similar una T_b aún más alta (43 °C).

15 Las tasas de liberación significativamente diferentes observadas cuando T_b está por debajo, a 37 °C o más, son indicativas del fuerte efecto del movimiento segmentario sobre la tasa de difusión y liberación del fármaco desde la nanopartícula. Los valores de T_g y T_e informados en la Tabla 7 (temperatura de transición vítrea y punto en el que la curva DSC es lineal nuevamente) también aumentan sistemáticamente entre los sistemas de liberación "rápido", "normal" y "lento". Este aumento está de acuerdo con la correlación entre el movimiento segmentario del polímero y las tasas de liberación del fármaco y confirma que la temperatura de transición vítrea de un sistema de nanopartículas dado en condiciones de suspensión proporciona un medio para predecir la tasa relativa de liberación del fármaco. La tasa absoluta de liberación depende adicionalmente de otros factores que incluyen la miscibilidad del fármaco-polímero, la solubilidad del fármaco en agua, el tamaño molecular del fármaco y la estructura de la fase del fármaco (amorfo o cristalino) dentro de la nanopartícula.

20 El componente de calor reversible del flujo térmico total observado en los experimentos de MDSC está libre de artefactos resultantes de relajaciones entálpicas producidas cerca de la transición vítrea endotérmica. Como tal, la MDSC proporciona una determinación más exacta del valor de T_g en comparación con la DSC convencional. El análisis de MDSC (datos mostrados en la Tabla 7B) ilustra que las nanopartículas obtenidas de una mezcla de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y PLA ($M_n = 6,5$ kDa) que exhiben una T_g a 37,8 °C también exhiben un perfil de liberación "rápida" con aproximadamente 75% del fármaco encapsulado que es liberado dentro de las primeras 4 horas de exposición al medio de liberación. Esto indica que cuando las temperaturas de transición vítrea de las nanopartículas son cercanas a 37 °C (temperatura fisiológica), un alto grado de movimiento segmentario conduce a una liberación relativamente rápida del fármaco encapsulado. Cuando las nanopartículas estaban compuestas solo por PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa), fue liberado aproximadamente 65% del fármaco encapsulado durante un período de tiempo similar. Un menor grado de movimiento segmentario en esta muestra de T_g más alta (40,1 °C) da como resultado una liberación correspondientemente más lenta del fármaco encapsulado. Esta tendencia continúa en nanopartículas obtenidas de una mezcla de PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) y PLA de alto peso molecular ($M_n = 75$ kDa), en la que una T_g aún mayor (= 43,0 °C) conduce a una liberación correspondientemente más lenta del fármaco encapsulado con solo aproximadamente 50% del fármaco liberado en las primeras 4 horas. La entrada 4 (Tabla 7B) muestra la temperatura de transición vítrea de una nanopartícula polimérica compuesta por PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) sin fármaco encapsulado. La comparación con un fármaco que contiene nanopartículas de composición polimérica similar (entrada 1, Tabla 7B) que contiene un fármaco encapsulado ilustra que el docetaxel afecta de manera considerable la temperatura de transición vítrea de una nanopartícula polimérica. En este caso, aproximadamente 10% en peso de docetaxel encapsulado aumenta el valor de T_g en 0,5 °C. Este conjunto de datos indica que los valores de T_g de las nanopartículas que contienen fármacos proporcionan un medio para predecir con exactitud las tasas de liberación de fármacos correspondientes. Otras mediciones, tal como la temperatura de transición vítrea de los componentes poliméricos y/o sus mezclas físicas con fármacos, pueden proporcionar tendencias generales, por ejemplo, el efecto del cambio en el peso molecular del polímero. Sin embargo, tales mediciones no permiten la clasificación de un fármaco específico que porta nanopartículas como de liberación rápida, moderada o lenta.

25 Los datos de DSC mostrados en las Figuras 3 a 7 para PLA-PEG recuperados de la fusión o precipitación y un PLA de masa molar baja ($M_n = 6,5$ kDa) o alta ($M_n = 75$ kDa) ilustran la fuerte dependencia del comportamiento térmico de estos componentes de nanopartículas poliméricas en su historial térmico, así como en la vía de procesamiento del polímero antes del análisis. Por lo tanto, las transiciones vítreas observadas para componentes poliméricos no se correlacionan directamente con las características térmicas de las nanopartículas. El procedimiento de fabricación de

nanopartículas imparte un historial térmico específico a los polímeros componentes y, además, imparte características morfológicas y de fase específicas a los copolímeros en bloque tal como PLA-PEG.

El comportamiento térmico de los componentes poliméricos afecta la temperatura de transición vítrea de una manera predecible. Por ejemplo, las nanopartículas obtenidas de una mezcla 1:1 (p/p) de PLA de bajo peso molecular ($M_n = 6,5$ kDa) y PLA-PEG (16 kDa - 5 kDa) exhiben una T_g menor que la exhibida por las nanopartículas obtenidas de una mezcla similar excepto que con PLA de alto peso molecular (75 kDa). Este resultado está basado en que T_g (75 kDa PLA) es mayor que T_g (6,5 kDa PLA) en aproximadamente 20 °C. La diferencia en T_g permite la selección de composiciones de nanopartículas para modular la tasa de liberación del fármaco. Sin embargo, las temperaturas de transición reales de las nanopartículas obtenidas de tales componentes poliméricos no pueden ser predichas a partir de los valores de T_g de los componentes poliméricos.

Ejemplo 8: Efecto de la temperatura sobre la tasa de liberación de fármaco

Para someter a prueba adicionalmente el papel de la temperatura de transición vítrea de nanopartículas en los sistemas de liberación "rápida", "normal" y "lenta", son sometidas a prueba las tasas de liberación del fármaco a tres temperaturas distintas de 37 °C. Estas temperaturas incluyeron 32 °C, es decir, 3 - 5 °C por debajo de la temperatura de inicio más baja (T_b), y 52 °C, un incremento similar por encima de la temperatura final de transición más alta (T_e). Además, la tasa de liberación es determinada a 25 °C para verificar el comportamiento a una temperatura considerablemente inferior a la T_g de los tres sistemas de nanopartículas.

Los resultados son mostrados en la Figura 13, con una expansión del período de tiempo de 1-4 horas que se muestra en la Figura 14. A 25 °C, los tres sistemas de nanopartículas, a pesar de su diferente inicio de temperaturas de transición vítrea (T_b), exhibieron una tasa similar de liberación de fármaco (véanse los puntos de datos mostrados como triángulos en las Figuras 13 y 14). Esta observación confirma que, a temperaturas muy inferiores a la T_g de los tres sistemas, el movimiento segmentario es limitado en todos los casos, de modo que las tasas de transporte y liberación de fármacos son similares y relativamente lentas.

A 52 °C, los tres sistemas de nanopartículas exhiben una tasa acelerada de liberación de fármaco que confirma que, a temperaturas muy superiores a sus temperaturas de transición vítrea, los núcleos de nanopartículas son igualmente plásticos (gomosos). Por lo tanto, las tasas de difusión del fármaco son comparables y las tasas de liberación se vuelven casi idénticas con la liberación de casi todo el fármaco dentro de los primeros 30 minutos a 52 °C (ver datos mostrados como cuadrados en las Figuras 13 y 14). La liberación inmediata observada para los tres sistemas de nanopartículas a 52 °C refleja las tendencias observadas a 37 °C, con sistemas de liberación "lenta", "normal" y "rápida" que liberan 45%, 65% y 75% de su contenido de fármaco inmediatamente.

A 32 °C, las tasas de liberación son similares, pero más altas (para todos los sistemas) que las observadas a 25 °C (véanse los datos mostrados como círculos en las Figuras 13 y 14). Estos resultados sugieren una dependencia de la temperatura del coeficiente de difusión del fármaco en el núcleo polimérico y de la solubilidad en agua, ambos parámetros aumentan a una temperatura más alta y conducen al aumento observado en las tasas de liberación del fármaco.

Ejemplo 9: Nanopartículas de docetaxel

Las nanopartículas de docetaxel que comprenden varios copolímeros de PLA-PEG son preparadas usando la siguiente formulación: 10% (p/p) de fármaco teórico y 90% (p/p) de polímero-PEG (16-5, 30-5, 50-5 u 80-5 PLA-PEG). % de sólidos totales = 20%. Los disolventes usados son 21% de alcohol bencílico y 79% de acetato de etilo (p/p). Para un tamaño de lote de 1 gramo, son mezclados 100 mg de fármaco con 900 mg de polímero-PEG (16-5, 30-5, 50-5 u 80-5 PLA-PEG).

Las nanopartículas de docetaxel son producidas de la siguiente manera. Para preparar una solución de fármaco/polímero, son añadidas cantidades apropiadas de docetaxel y polímero a un vial de vidrio junto con cantidades adecuadas de acetato de etilo y alcohol bencílico. La mezcla es agitada en vórtex hasta que el fármaco y el polímero son disueltos por completo.

Es preparada una solución acuosa. La fase acuosa para la formulación de 16-5 PLA-PEG contiene 0,5% de colato de sodio, 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo en agua. La formulación 30-5 PLA-PEG contiene 5% de colato de sodio, 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo en agua, % de sólidos totales = 20%. La fase acuosa para la formulación 50-5 PLA-PEG contiene 5% de colato de sodio, 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo en agua, % de sólidos totales = 20%. La fase acuosa para la formulación 80-5 PLA-PEG contiene 5% de colato de sodio, 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo en agua, % de sólidos totales = 20%. Cuando es usado polímero-PEG de mayor peso molecular (es decir, 30-5, 50-5 u 80-5 de PLA-PEG), la concentración de tensioactivo de colato de sodio en la fase acuosa aumenta de 0,5% a 5% para obtener nanopartículas con tamaños similares a las partículas que comprenden 16-5 PLA-PEG. Específicamente, son añadidas cantidades adecuadas de colato de sodio y agua DI a una botella y son mezcladas usando una placa de agitación hasta que son disueltas. Después, son añadidas cantidades adecuadas de alcohol bencílico y acetato de etilo a la mezcla de colato de sodio/agua y son mezcladas usando una placa de agitación hasta que son disueltas.

Es formada una emulsión mediante la combinación de la fase orgánica en la solución acuosa en una relación de 5:1 (fase acuosa:fase oleosa). La fase orgánica es vertida en la solución acuosa y homogeneizada usando un homogeneizador manual a temperatura ambiente para formar una emulsión gruesa. La solución se alimenta posteriormente a través de un homogeneizador de alta presión (110S) para formar una nanoemulsión.

- 5 La emulsión es inactivada en agua DI fría a < 5 °C mientras es agitada en una placa de agitación. La relación de inactivación a emulsión es 8:1. Después, es añadido Tween 80 en agua a la emulsión enfriada en una relación de 25:1 (Tween 80: fármaco).

- 10 Las nanopartículas son concentradas a través de filtración de flujo tangencial (TFF) seguido de diafiltración para eliminar disolventes, fármaco no encapsulado y Tween 80 (solubilizante). Una emulsión inactivada es concentrada inicialmente a través de TFF usando un casete Pall de 300 KDa (dos membranas de 0,1 m) a un volumen de aproximadamente 100 ml. Esto es seguido por diafiltración usando aproximadamente 20 diavolúmenes (2 L) de agua DI fría. El volumen es minimizado antes de la recolección, después son añadidos 100 ml de agua fría al recipiente y son bombeados a través de la membrana para enjuagar. Son recolectados aproximadamente 100-180 ml de material en total en un vial de vidrio. Las nanopartículas son concentradas adicionalmente usando un TFF más pequeño hasta un volumen final de aproximadamente 10-20 ml.

Para determinar la concentración de sólidos de la suspensión final sin filtrar, es añadido un volumen de suspensión final a un vial de centelleo tarado de 20 ml y es secado al vacío en liofilizador/horno. Después, el peso de las nanopartículas es determinado en el volumen de la suspensión seca. Es añadida sacarosa concentrada (0,666 g de sacarosa/g total) a la muestra de suspensión final para lograr una concentración final de 10% de sacarosa.

- 20 Para determinar la concentración de sólidos de una suspensión final filtrada de 0,45 µm, es filtrado un volumen predeterminado de la muestra final de suspensión antes de la adición de sacarosa usando un filtro de jeringa de 0,45 µm. Posteriormente es añadido un volumen de la muestra filtrada a un vial de centelleo tarado de 20 ml, es secado al vacío en liofilizador/horno y es determinado el peso gravimétricamente. La muestra restante de la suspensión final sin filtrar es congelada con sacarosa.
- 25 La tabla A proporciona el tamaño de partícula y la carga de fármaco de las nanopartículas de docetaxel producidas como es descrito anteriormente.

Tabla A

Polímero	Carga de DTXL %	Tamaño (nm)
16/5 PLA/PEG	4,05	110,70
30/5 PLA/PEG	1,48	129,00
50/5 PLA/PEG	2,75	170,60
80/5 PLA/PEG	3,83	232,00

- 30 Como se muestra en la Tabla A, las nanopartículas de docetaxel que comprenden 50-5 PLA-PEG y 80-5 PLA-PEG dan como resultado una carga de fármaco de aproximadamente 2,75% y 3,83%, respectivamente.

La prueba de liberación *in vitro* es realizada en las nanopartículas de docetaxel descritas anteriormente. Como se ilustra en la Figura 15, las nanopartículas fabricadas usando 50-5 PLA-PEG o 80-5 PLA-PEG ralentizaron la liberación de docetaxel de las nanopartículas en comparación con las nanopartículas que tienen PLA-PEG de bajo peso molecular.

35 **Ejemplo 10: Nanopartículas de bortezomib**

- Las nanopartículas de bortezomib que comprenden varios copolímeros de PLA-PEG son preparadas usando la siguiente formulación: 30% (p/p) de fármaco teórico y 70% (p/p) de polímero-PEG (16/5, 30-5, 50-5, 65-5, o 80-5 PLA-PEG). % de sólidos totales = 20%. Los disolventes usados son 21 % de alcohol bencílico y 79% de acetato de etilo (p/p). Para un tamaño de lote de 1 gramo, son mezclados 300 mg de fármaco con 700 mg de polímero-PEG (16/5, 30-5, 50-5, 65-5 u 80-5 PLA-PEG).

Las nanopartículas de bortezomib son preparadas usando un protocolo similar al protocolo descrito anteriormente para las nanopartículas de docetaxel.

La Tabla B proporciona el tamaño de partícula y la carga de fármaco de las nanopartículas de bortezomib producidas como es descrito anteriormente.

Tabla B

Polímero	Carga de BTZ %	Tamaño (nm)
16/5 PLA/PEG	3	107
30/5 PLA/PEG	1	108
50/5 PLA/PEG	2,7	106
65/5 PLA/PEG	0,2	155
80/5 PLA/PEG	0,67	149

La prueba de liberación *in vitro* es realizada en las nanopartículas de bortezomib descritas anteriormente. Como se ilustra en la Figura 16, la incorporación de 50-5 PLA-PEG ralentizó la liberación de bortezomib de las nanopartículas.

Ejemplo 11: Nanopartículas de vinorelbina

- 5 Las nanopartículas de vinorelbina que comprenden copolímero de PLA-PEG 16-5 o 50-5 son preparadas usando la siguiente formulación: 20% (p/p) de fármaco teórico y 80% (p/p) de polímero-PEG (16/5 o 50-5 PLA-PEG). Para las nanopartículas que comprenden 16-5 PLA-PEG: % de sólidos totales = 20%; para las nanopartículas que comprenden 50-5 PLA-PEG: % de sólidos totales = 30%. Para todas las nanopartículas: los disolventes usados son 21% de alcohol bencílico y 79% de acetato de etilo (p/p).
- 10 Las nanopartículas de vinorelbina son preparadas usando un protocolo similar al protocolo descrito anteriormente para las nanopartículas de docetaxel.

La Tabla C proporciona el tamaño de partícula y la carga de fármaco de las nanopartículas de vinorelbina producidas como es descrito anteriormente.

Tabla C

Polímero	Carga de fármaco %	Tamaño (nm)
16/5 PLA/PEG	10	101
50/5 PLA/PEG	8,4	109

- 15 La prueba de liberación *in vitro* es realizada en las nanopartículas de vinorelbina descritas anteriormente. Como se ilustra en la Figura 17, las nanopartículas obtenidas usando 50-5 PLA-PEG produjeron una liberación más lenta de vinorelbina de las nanopartículas en comparación con las nanopartículas preparadas con 16-5 PLA-PEG.

Ejemplo 12: Nanopartículas de vincristina

- 20 Las nanopartículas de vincristina que comprenden copolímero de PLA-PEG 16-5 o 50-5 son preparadas usando la siguiente formulación: 20% (p/p) de fármaco teórico y 80% (p/p) de polímero-PEG (16/5 o 50-5 PLA-PEG). Para las nanopartículas que comprenden 16-5 PLA-PEG: % de sólidos totales = 40%; para las nanopartículas que comprenden 50-5 PLA-PEG: % de sólidos totales = 20%. Para todas las nanopartículas: los disolventes usados son 21% de alcohol bencílico y 79% de acetato de etilo (p/p).
- 25 Las nanopartículas de vincristina son preparadas usando un protocolo similar al protocolo descrito anteriormente para las nanopartículas de docetaxel. La Tabla D proporciona el tamaño de partícula y la carga de fármaco de las nanopartículas de vinorelbina producidas como es descrito anteriormente.

Tabla D

Polímero	Carga de fármaco %	Tamaño (nm)
16/5 PLA/PEG	2,9	103
50/5 PLA/PEG	2,8	122

- 30 La prueba de liberación *in vitro* es realizada en las nanopartículas de vincristina descritas anteriormente. Como se

ilustra en la Figura 18, la incorporación de 50-5 PLA-PEG ralentizó la liberación de vincristina de las nanopartículas.

Ejemplo 13: Nanopartículas de bendamustina

5 Las nanopartículas de bendamustina HCl que comprenden copolímero de PLA-PEG 16-5 o 50-5 son preparadas usando la siguiente formulación: 17% (p/p) de fármaco teórico y 83% (p/p) de polímero-PEG (16/5 o 50-5 PLA-PEG) a 20% (p/p) de concentración de polímero en cloruro de metileno. La bendamustina HCl es complejada con tetrafenilborato de sodio a una relación de 1:1. % de sólidos totales = 40%. Los disolventes usados son 32% de alcohol bencílico y 68% de cloruro de metileno (p/p).

10 Las nanopartículas de bendamustina son preparadas usando un protocolo similar al protocolo descrito anteriormente para las nanopartículas de docetaxel, con una etapa adicional en la que el cloruro de metileno es eliminado de la emulsión en un rotovapor aplicando vacío mientras la emulsión es girada en un baño de hielo durante 10 minutos.

La Tabla E proporciona el tamaño de partícula y la carga de fármaco de las nanopartículas de vinorelbina producidas como se describe anteriormente.

Tabla E

Polímero	Carga de fármaco %	Tamaño (nm)
16/5 PLA/PEG	3,5	97
50/5 PLA/PEG	2,1	202

15 La prueba de liberación *in vitro* es realizada en las nanopartículas de bendamustina descritas anteriormente. Como se ilustra en la Figura 19, las nanopartículas obtenidas con 50-5 PLA-PEG demostraron una liberación más lenta de bendamustina de las nanopartículas en comparación con las nanopartículas obtenidas con 16-5 PLA-PEG.

Ejemplo 14: Preparación de nanopartículas con epotilona

Las nanopartículas de Epotilona B son producidas usando las siguientes formulaciones:

20 10% (p/p) de fármaco teórico 90% (p/p)

Polímero-PEG, 16-5 PLA-PEG o 50-5 PLA-PEG

% de sólidos totales = 20%

Disolventes: 21% de alcohol bencílico, 79% de acetato de etilo (p/p)

25 Para un tamaño de lote de 1 gramo, son mezclados 100 mg de fármaco con 900 mg de Polímero-PEG:16-5 o 50-5 PLA-PEG.

30 Las nanopartículas de epotilona B son producidas de la siguiente manera. Para preparar una solución de fármaco/polímero, son añadidos 100 mg de epotilona B a un vial de vidrio de 7 ml junto con 3,16 g de acetato de etilo. La mezcla es agitada en vórtex hasta que el fármaco es disuelto en su mayor parte. Después, son añadidos 0,840 g de alcohol bencílico al vial de vidrio y agitados en vórtex hasta que el fármaco es disuelto por completo. Finalmente, son añadidos 900 mg de polímero-PEG a la mezcla y agitados hasta su disolución.

35 Es preparada una solución acuosa para una formulación de 16-5 PLA-PEG o una formulación de 50-5 PLA-PEG. La solución acuosa de la formulación 16-5 PLA-PEG contiene 0,1% de colato de sodio, 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo en agua. Específicamente, son añadidos 1 g de colato de sodio y 939 g de agua DI a una botella de 1 L y son mezclados usando una placa de agitación hasta su disolución. Después, son añadidos 20 g de alcohol bencílico y 40 g de acetato de etilo a la mezcla de colato de sodio/agua y son mezclados usando una placa de agitación hasta su disolución total. La solución acuosa para la formulación 50-5 PLA-PEG contiene 5% de colato de sodio, 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo en agua. Específicamente, son añadidos 50 g de colato de sodio y 890 g de agua DI a una botella de 1 L y son mezclados usando una placa de agitación hasta su disolución. Después, son añadidos 20 g de alcohol bencílico y 40 g de acetato de etilo a la mezcla de colato de sodio/agua y son mezclados usando una placa de agitación hasta su disolución total.

45 Es formada una emulsión mediante la combinación de la fase orgánica en la solución acuosa en una relación de 5:1 (fase acuosa:fase oleosa). La fase orgánica es vertida en la solución acuosa y homogeneizada usando un homogeneizador de mano durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión gruesa. La solución se alimentó posteriormente a través de un homogenizador de alta presión (110S). Para la formulación 16-5 PLA-PEG, la presión es ajustada a 62,05 MPa para dos pasajes separados para formar la nanoemulsión. Para la formulación 50-5 PLA-PEG, la presión es ajustada a 0,3 MPa en el medidor (68,3 MPa) para dos pasajes separados y después es

aumentada a 0,41 MPa en el medidor (91,0 MPa) para dos pasajes adicionales.

La emulsión es inactivada en agua DI fría a < 5 °C mientras es agitada en una placa de agitación. La relación de inactivación a emulsión fue de 8:1. Después, es añadido Tween 80 a 35% (p/p) en agua a la emulsión inactivada en una relación de 25:1 (Tween 80: fármaco).

5 Las nanopartículas son concentradas a través de filtración de flujo tangencial (TFF) seguido de diafiltración para eliminar disolventes, fármaco no encapsulado y solubilizante. Una emulsión inactivada es concentrada inicialmente a través de TFF usando un casete Pall de 300 KDa (dos membranas de 0,1 m) a un volumen de aproximadamente 100 ml. Esto es seguido por diafiltración usando aproximadamente 20 diavolumenes (2 L) de agua DI fría. El volumen es minimizado antes de la recolección, después son añadidos 100 ml de agua fría al recipiente y bombeados a través de la membrana para enjuagar. Son recolectados aproximadamente 100-180 ml de material en un vial de vidrio. Las nanopartículas son concentradas adicionalmente usando un TFF más pequeño hasta un volumen final de aproximadamente 10-20 ml.

15 Para determinar la concentración de sólidos de la suspensión final sin filtrar, es añadido un volumen de suspensión final a un vial de centelleo tarado de 20 ml y secado al vacío en liofilizador/horno. Después, el peso de las nanopartículas es determinado en el volumen de la suspensión seca. Es añadida sacarosa concentrada (0,666 g de sacarosa/g total) a la muestra de suspensión final para alcanzar una concentración final de sacarosa de 10%.

20 Para determinar la concentración de sólidos de la suspensión final filtrada de 0,45 µm, es filtrada una porción de la muestra final de la suspensión antes de la adición de sacarosa usando un filtro de jeringa de 0,45 µm. Después es añadido un volumen de la muestra filtrada a un vial de centelleo tarado de 20 ml y secado al vacío en liofilizador/horno. La muestra restante de la suspensión final sin filtrar es congelada después de la disolución de sacarosa (10% en peso) en esta.

25 El tamaño de partícula es analizado mediante dos técnicas: dispersión dinámica de luz (DLS) y difracción láser. La DLS es realizada usando un instrumento Brookhaven ZetaPals a 25 °C en suspensión acuosa diluida usando un láser de 660 nm dispersado a 90° y analizado usando los procedimientos Cumulants y NNLS (TP008). La difracción láser es realizada con un instrumento Horiba LS950 en suspensión acuosa diluida usando un láser HeNe a 633 nm y un LED a 405 nm, dispersado a 90° y analizado usando el modelo óptico Mie (TP009).

La Tabla F proporciona el tamaño de partícula y la carga de fármaco de las partículas descritas anteriormente.

TABLA F

Formulación	Descripción	Carga de EpoB (%)	Tamaño de partícula (nm)
16/5 PLA/PEG	20% de sólidos, 2 pasajes a 68,2 MPa	2,3	91
50/5 PLA/PEG	20% de sólidos, 2 pasajes a 68,2 MPa y 2 pasajes a 91,0 MPa	1,6	174

30 **Ejemplo 15: Liberación *in vitro***

Para determinar la liberación *in vitro* de epotilona B de las nanopartículas, las nanopartículas son suspendidas en medios de liberación de PBS e incubadas en un baño de agua a 37 °C. Las muestras son recolectadas en puntos de tiempo específicos. Es usado un procedimiento de ultracentrifugación para separar el fármaco liberado de las nanopartículas.

35 La Figura 20 muestra los resultados de un estudio de liberación *in vitro* en las formulaciones 16-5 PLA-PEG y 50/5 PLA/PEG. Los datos muestran una liberación de 100% de Epo B de la formulación 16/5 PLA/PEG después de una hora. La formulación 50/5 PLA/PEG es una formulación de liberación más lenta con 50% de liberación en 1 hora, 60% de liberación en 2 horas, 70% de liberación en 4 horas y más de 80% de liberación de fármaco en 24 horas. Las dos formulaciones demuestran la capacidad de encapsular el epotilona B en nanopartículas y la capacidad de afectar la liberación *in vitro* a través de la selección del tipo de polímero usado en la formulación.

40 **Ejemplo 16 : Preparación de nanopartículas - budesonida**

45 Todos los lotes de budesonida son producidas de la siguiente manera, a menos que se indique lo contrario. Los constituyentes de fármaco y polímero (16/5 PLA-PEG) son disueltos en el sistema de disolvente orgánico en fase oleosa, típicamente 70% de acetato de etilo (EA) y 30% de alcohol bencílico (BA), a 20% o 30% en peso [sólidos]. La fase acuosa consiste principalmente en agua, presaturada con 2% de alcohol bencílico y 4% de acetato de etilo, con colato de sodio (SC) como tensioactivo. La emulsión O/W gruesa es preparada mediante el vertido de la fase oleosa en la fase acuosa bajo homogenización del estator y rotor a una relación oleosa:acuosa de 1:5 o 1:10. La emulsión

5 fina posteriormente es preparada mediante el procesamiento de la emulsión gruesa a través de un homogenizador de alta presión Microfluidics (generalmente MHOS neumático) a 62,05 Mpa a través de una cámara de interacción Z de 100 μm . Después, la emulsión es inactivada en una inactivación con agua DI fría a una relación 10:1 o 5:1 de inactivación:emulsión. Después, es añadido polisorbato 80 (Tween 80) como un solubilizante de proceso para solubilizar el fármaco sin encapsular. Después, el lote es procesado con ultrafiltración seguido de diafiltración para eliminar disolventes, fármaco no encapsulado y solubilizante. Este procedimiento es representado gráficamente en las Figuras 1 y 2.

10 Las mediciones del tamaño de partícula son realizadas por difracción láser Brookhaven DLS y/o Horiba. Para determinar la carga del fármaco, son enviadas muestras de suspensión para análisis HPLC y [sólidos]. Las fracciones retenidas de la suspensión son diluidas con sacarosa al 10% antes de su congelamiento. Todas las relaciones enumeradas son p/p, a menos que se especifique lo contrario. Puede ser usado Tween 80 después del enfriamiento para eliminar el fármaco sin encapsular.

15 Es usado un procedimiento de liberación *in vitro* para determinar la liberación de la fase inmediata inicial de nanopartículas tanto en condiciones ambientales como a 37 °C. Las nanopartículas son colocadas en condiciones de hundimiento para API y son mezcladas en un baño de agua. El fármaco liberado y encapsulado es separado mediante el uso de una ultracentrífuga.

20 El sistema centrífugo es ejecutado de la siguiente manera: 3 ml de suspensión de nanopartículas de budesonida (aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de nanopartículas de budesonida PLGA/PLA) en agua DI son colocados en botellas de vidrio que contienen 130 ml de medio de liberación (hidroxil beta ciclodextrina 2,5% en 1x PBS), que son agitadas continuamente a 150 rpm usando un agitador. En puntos de tiempo predeterminados, son extraídas alícuotas de muestras (4 ml). Las muestras son centrifugadas a 236.000 g durante 60 minutos y el contenido de budesonida en el sobrenadante es sometido a ensayos para determinar el contenido de budesonida liberado medido.

25 El tamaño de partícula es analizado mediante dos técnicas: dispersión dinámica de luz (DLS) y difracción láser. La DLS es realizada usando un instrumento Brookhaven ZetaPals a 25 °C en suspensión acuosa diluida usando un láser de 660 nm dispersado a 90° y analizado usando los procedimientos Cumulants y NNLS. La difracción láser es realizada con un instrumento Horiba LS950 en suspensión acuosa diluida usando un láser HeNe a 633 nm y un LED a 405 nm, dispersado a 90° y analizado usando el modelo óptico Mie (TP009).

Ejemplo 17

30 Son preparadas nanopartículas con diversas cargas de fármacos mediante la variación de los siguientes parámetros: variación de la relación Q:E (5:1, 15:1 y 30:1); aumento [sólidos] al 30% mediante la reducción de la [budesonida] inicial a 10%; aumento del tamaño de partícula mediante la reducción del tensioactivo a 0,5%.

35 Es preparada una única emulsión con 30% de sólidos, 10% de fármaco, y la emulsión es dividida en tres inactivadores diferentes en relaciones Q:E de 5:1, 15:1 y 30:1. El tamaño de partícula es de 137 nm y la carga de fármacos oscila de 3,4% a 4%. El aumento de la carga del fármaco puede ser debido al aumento [sólidos] y al tamaño de partícula, mientras que la relación Q:E variable no parece tener un efecto significativo sobre la carga del fármaco.

Es preparado un lote de 10 g para escalar usando la formulación y el proceso del Ejemplo 16, usando 30% de sólidos y 10%. Es usado un homogeneizador eléctrico de alta presión Microfluidics M110EH para preparar este lote a 6,20 MPa usando una cámara Z de 200 μm . El tamaño de partícula es de 113 nm y la carga de fármaco es de 3,8% (Lote 55-40, control).

Ejemplo 18: Nanopartículas

Son preparados varios lotes en nanopartículas usando el procedimiento general del Ejemplo 16, y usando los siguientes parámetros:

16/5 PLA-PEG con PLA MW medio (IV (viscosidad inherente) = 0,3) a 40% de sólidos: Lote #52-198

45 16/5 PLA-PEG con 40% [sólidos]; 10% de fármaco, usando 60/40 de acetato de etilo/alcohol bencílico Lote: #58-27-1

16/5 PLA-PEG con 40% [sólidos] y 5% [fármaco]: Lote #58-27-2

16/5 PLA-PEG con PLA MW alto (IV=0,6-0,8) a 40% de sólidos:Lote #41- 171-A

PLA MW alto (IV=0,6-0,8) con DSPE-PEG(2k): Lote #41-171-B & 61-8-B

16/5 PLA-PEG con PLA MW alto (IV=0,6-0,8) a 75% de sólidos: Lote #41-176

50 16/5 PLA-PEG con PLA MW alto dopado (IV=0,6-0,8) a 75% y 50% de sólidos: Lote #41-183-A&B

PLA MW medio es obtenido de Surmodics (también denominado Lakeshore (LS)), con una viscosidad

ES 2 780 156 T3

inherente de 0,3. 16/5 PLA-PEG es obtenido de Boehringer Ingelheim (lote 41-176) o Polymer Source (lote 41-183). PLA MW alto con un M_n de 80 kDa, M_w de 124 kDa es obtenido de Surmodics.

La Tabla G indica el tamaño y carga de fármaco de los lotes de nanopartículas:

Lote Núm.	Descripción	Tamaño (nm)	Carga de fármaco
52-198	PLA MW medio dopado	120	7,08%
58-27-1	Más alto [sólidos]	153	4,28%
58-27-2	Más alto [sólidos] y más bajo inicial [fármaco]	101	1,92%
41-171-A	PLA MW alto dopado	117	4,21%
41-171-B	High MW PLA con DSPE-PEG	224	6,11%
41-176	PLA MW alto dopado a 75%	181	5,14%
41-183-A	PLA MW alto dopado a 75%	176	1,90%
41-183-B	PLA MW alto dopado a 50%	125	1,72%
61-8-B	PLA MW alto con DSPE-PEG	168	3,2%

- 5 La liberación *in vitro* de cada lote es representado en la Figura 21. Nota: El lote 41-171-A en el punto de tiempo de 1 hora es un valor atípico causado por una de las muestras no centrifugadas con una lectura extraordinariamente baja. Ambos lotes 41-171-B (formulación de lípidos) y 41-183-A (PLA MW alto) muestran liberación de fármaco $\leq 50\%$ a las 2 horas, mientras que en las otras formulaciones había sido observada liberación entre 70-100% dentro de 2 horas.

Ejemplo 19: Lote para estudio en animales

- 10 Es preparado un lote de 10 g para confirmar la carga y liberación del fármaco observada en los lotes 41-176 y 41-183-A, así como para proporcionar material para estudios en animales. El tamaño de partícula es de 183 nm y la carga de fármaco es de 5,03%. Los parámetros de formulación y procedimiento son escalados linealmente con la excepción de la fase acuosa [tensioactivo]. La Tabla H a continuación detalla las principales diferencias entre los lotes:

Tabla H

Parámetro o atributo	41-176	41-183A	62-30
Escala	1 g	1 g	10g
Suministro de polímero 16/5	Boehringer Ingelheim	Polymer Source	Boehringer Ingelheim
Colato de sodio	2%	5%	2,5%
Homogenizador	M110S	M110S	M110EH
Carga de fármaco	5,14%	1,73%	5,03%
PSD	181	176	183

- 15 El lote de 10 g, lote número 62-30, fue seleccionado para el estudio PK y fue sometido a prueba en primer lugar por la liberación del fármaco para asegurar que la liberación fuera similar a 41-176 y 41-183-A, como se muestra en la Figura 22.

Ejemplo 20 Estudio en ratas: farmacocinética

- 20 Se administró a ratas (Sprague Dawley macho, aproximadamente 300 g con cánulas yugulares) una dosis intravenosa única de 0,5 mg/kg de budesonida o nanopartículas de localizadas de manera pasiva que encapsulan budesonida (PTNP) (preparada como en el Ejemplo 16) en un tiempo = 0. En diversos momentos después de la dosificación, son recolectadas muestras de sangre de las cánulas yugulares en tubos que contienen heparina de litio, y fue preparado plasma. Los niveles plasmáticos son determinados por extracción de la budesonida del plasma seguido por análisis LCMS. Los resultados de este estudio PK se muestran en la Figura 23.
- 25

5 La encapsulación de budesonida en nanopartículas de copolímero dio como resultado un aumento de 11 veces en la concentración plasmática máxima (C_{máx}), un aumento de 4 veces en la vida media (t_{1/2}) y un aumento de 36 veces en el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC). La encapsulación de budesonida también reduce el volumen de distribución (V_z) en 9 veces y reduce la depuración del plasma (Cl) en 37 veces. Cada uno de estos cambios en los parámetros indica que la encapsulación de budesonida en nanopartículas promueve la localización plasmática de la budesonida a expensas de la distribución tisular del esteroide. La Tabla I describe los análisis farmacocinéticos de budesonida y budesonida PTNP.

TABLA I

Grupo 1: Budesonida								
	Rata 1-1	Rata 1-2	Rata 1-3	Rata 1-4	Rata 1-5	Rata 1-6	Prom.	Des. est.
C _{máx} (ng/ml)	324	241	226	337	306	279	286	45
t _{1/2} (hr)	0,73	0,75	0,74	0,69	0,70	0,87	0,75	0,06
AUC _{inf} (hr*ng/ml)	159	126	108	161	159	173	148	25
V _z (ml/kg)	3311	4291	4937	3104	3191	3627	3744	727
Cl (ml/hr/kg)	3136	3966	4611	3104	3151	2892	3477	668
Grupo 2: Budesonida PTNP								
	Rata 2-1	Rata 2-2	Rata 2-3	Rata 2-4:	Rata 2-5	Rata 2-6	Prom	des. est.
C _{máx} (ng/ml)	3180	3750	4140	3330	2800	2260	3243	669
t _{1/2} (hr)	2,66	2,95	3,18	3,00	2,98	2,8	2,9	0,2
AUC _{inf} (hr*ng/ml)	5614	6666	5760	4686	4299	5245	5378	839
V _z (ml/kg)	341	319	398	463	501	383	400,8	70,0
Cl (ml/hr/kg)	89	75	87	107	116	95	94,8	

10 **Ejemplo 21; Modelo de rata de enfermedad inflamatoria**

Budesonida y Budesonida PTNP son comparadas en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) como un modelo de eficacia de la inflamación. En este modelo, las ratas hembras recibieron dos dosis subcutáneas de 8 mg/kg de indometacina en intervalos de 24 horas para inducir lesiones que se asemejan a las que se producen en la enfermedad de Crohn en el intestino delgado. El tratamiento intravenoso diario con vehículo, budesonida (0,02, 0,2 o 2 mg/kg) o budesonida PTNP (0,02, 0,2 o 2 mg/kg) o el tratamiento diario oral con Dexametasona (0,1 mg/kg) es iniciado un día antes del tratamiento con indometacina (día -1) y continuado durante 5 días en total (días -1 a 3). Los animales fueron sacrificados el día 4, y un área de 10 cm fue calificada en riesgo en el intestino delgado para patología macroscópica y fue pesada.

15 Usando un sistema de puntuación de enfermedad en el que una puntuación de 0 es normal, y una puntuación de 5 indica muerte por síntomas de IBD, las ratas normales tienen una puntuación promedio de 0, y un peso intestinal promedio de 0,488 g. En contraste, los controles tratados con vehículo con IBM inducida por indometacina tienen una puntuación clínica promedio de 2,7 (Figura 24) y un peso intestinal de 2,702 g (Figura 25). Las puntuaciones intestinales disminuyeron significativamente hacia la normalidad después del tratamiento con budesonida a dosis de 0,02 mg/kg (disminución de 52%), 0,2 mg/kg (disminución de 53%) y 2 mg/kg (disminución de 59%; Figura 24). Del

5 mismo modo, las puntuaciones intestinales disminuyeron significativamente hacia la normalidad después del tratamiento con budesonida PTNP a dosis de 0,02 mg/kg (disminución de 59%), 0,2 mg/kg (disminución de 96%) y 2 mg/kg (disminución de 93%; Figura 24). Las puntuaciones del intestino delgado también disminuyeron significativamente con el tratamiento con 0,2 mg/kg de budesonida PTNP (94%) o 2 mg/kg de budesonida PTNP (85%) en comparación con los animales tratados con la misma dosis de fármaco libre de budesonida (Figura 25).

10 Los pesos del intestino delgado disminuyeron significativamente hacia la normalidad después del tratamiento con budesonida a dosis de 0,02 mg/kg (disminución de 52%), 0,2 mg/kg (disminución de 53%) o 2 mg/kg (disminución de 59%; Figura 8). Del mismo modo, los pesos intestinales disminuyeron significativamente hacia la normalidad después del tratamiento con budesonida PTNP a dosis de 0,02 mg/kg (disminución de 64%), 0,2 mg/kg (disminución de 93%) y 2 mg/kg (disminución de 90%; Figura 25). Los pesos del intestino delgado también disminuyeron significativamente con el tratamiento con 0,2 mg/kg de budesonida PTNP (86%) o 2 mg/kg de budesonida PTNP (74%) en comparación con los animales tratados con la misma dosis de fármaco libre de budesonida (Figura 24). Los resultados de este estudio indican que el tratamiento intravenoso diario con budesonida o budesonida PTNP inhibe significativamente los parámetros clínicos asociados con la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por indometacina en ratas, y el tratamiento con budesonida PTNP tuvo un efecto beneficioso significativo respecto del tratamiento con budesonida a los niveles de dosis correspondientes.

Ejemplo 22: partículas con copolímeros alternados

Seguendo el procedimiento general del Ejemplo 16, son formadas nanopartículas a partir de budesonida con copolímeros de PLA-PEG de la siguiente manera:

20 50/5 PLA-PEG:(PLA Mw=50; PEG Mw=5); Lote # 55- 106-A

50/5 PLA-PEG y PLA MW alto (75 Mn): Lote #55- 106-B

80/10 PLA-PEG: Lote # 55- 106-A

80/10 PLA-PEG y PLA MW alto: 55- 106-B

25 Los lotes B y D tienen PLA MW alto 75 Mn dopado a 50% del polímero total. La Tabla J muestra la carga de fármaco en porcentaje en peso:

Lote Núm.	Descripción	Carga de fármaco
55-106-A	50/5 PLA-PEG	2,30%
55-106-B	50/5 PLA-PEG con PLA MW alto dopado	3,10%
55-106-C	80-10 PLA-PEG	1,40%
55-106-D	80/10 PLA-PEG con PLA MW alto dopado	1,50%

Es realizado un estudio de liberación del fármaco para determinar si el cambio del MW del copolímero tuvo un efecto en la ralentización de la liberación del fármaco. La Figura 26 muestra el lote # 55-106-B, es decir, 50/5 PLA-PEG dopado con PLA MW alto, que es en apariencia similar a la formulación de control, 62-30.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cribado de suspensiones de nanopartículas para identificar una suspensión que tiene una tasa de liberación de fármaco específica, que comprende:
 - 5 (a) preparar por separado una pluralidad de suspensiones que tienen nanopartículas que comprenden un agente terapéutico, y 10 a 99 por ciento en peso de uno o más copolímeros de bloque que tienen al menos una porción hidrófoba seleccionada de ácido poli(D,L-láctico) o ácido poli(láctico)-ácido copoli(glicólico) y al menos una porción hidrófila que es un poli(etilenglicol), y opcionalmente 0 a 75 por ciento en peso de un homopolímero seleccionado de ácido poli(D,L-láctico); en el que cada suspensión está en un compartimento separado, cada suspensión comprende nanopartículas que tienen un peso molecular predeterminado del copolímero en bloque y si está presente, un peso molecular predeterminado del homopolímero;
 - (b) determinar la temperatura de transición vítrea de las nanopartículas cargadas con fármaco en cada una de las suspensiones; y
 - 15 (c) identificar la suspensión que tiene nanopartículas cargadas con fármaco con una temperatura de transición vítrea predeterminada entre 37 °C y 39,5 °C, 39,5 °C y 41 °C o 42 °C a 50 °C, identificando de este modo una suspensión con la tasa de liberación de fármaco específica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento además comprende:
 - (d) confirmar la tasa de liberación de fármaco específica de la suspensión usando una prueba de disolución *in vitro*.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la prueba de disolución *in vitro* comprende suspensión y centrifugación.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente terapéutico es seleccionado del grupo que consiste en alcaloides de la vinca, agentes de mostaza nitrogenada, inhibidores de mTOR y ésteres de boronato o compuestos de ácido borónico peptídico.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de la reivindicación 1 a 3, en el que el agente terapéutico es un agente taxano.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el agente taxano es docetaxel.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la porción del ácido poli(D,L-láctico) del copolímero de bloque tiene un peso molecular promedio en peso de 16 kDa, y la porción de poli(etilenglicol) del copolímero de bloque tiene un peso molecular promedio en peso de 5 kDa.
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la tasa de liberación de fármaco específica del agente terapéutico de la suspensión de nanopartículas es menor que 50% como es determinado en una prueba de disolución *in vitro* en un punto de tiempo de 4 horas.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la tasa de liberación de fármaco específica del agente terapéutico de la suspensión de nanopartículas está entre 70 y 100% como es determinado en una prueba de disolución *in vitro* en un punto de tiempo de 4 horas.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la temperatura de transición vítrea es determinada por calorimetría diferencial de barrido, modulada.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la temperatura de transición vítrea es determinada por calorimetría diferencial de barrido.
- 40 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la temperatura de transición vítrea predeterminada está entre 37 °C y 39,5 °C.

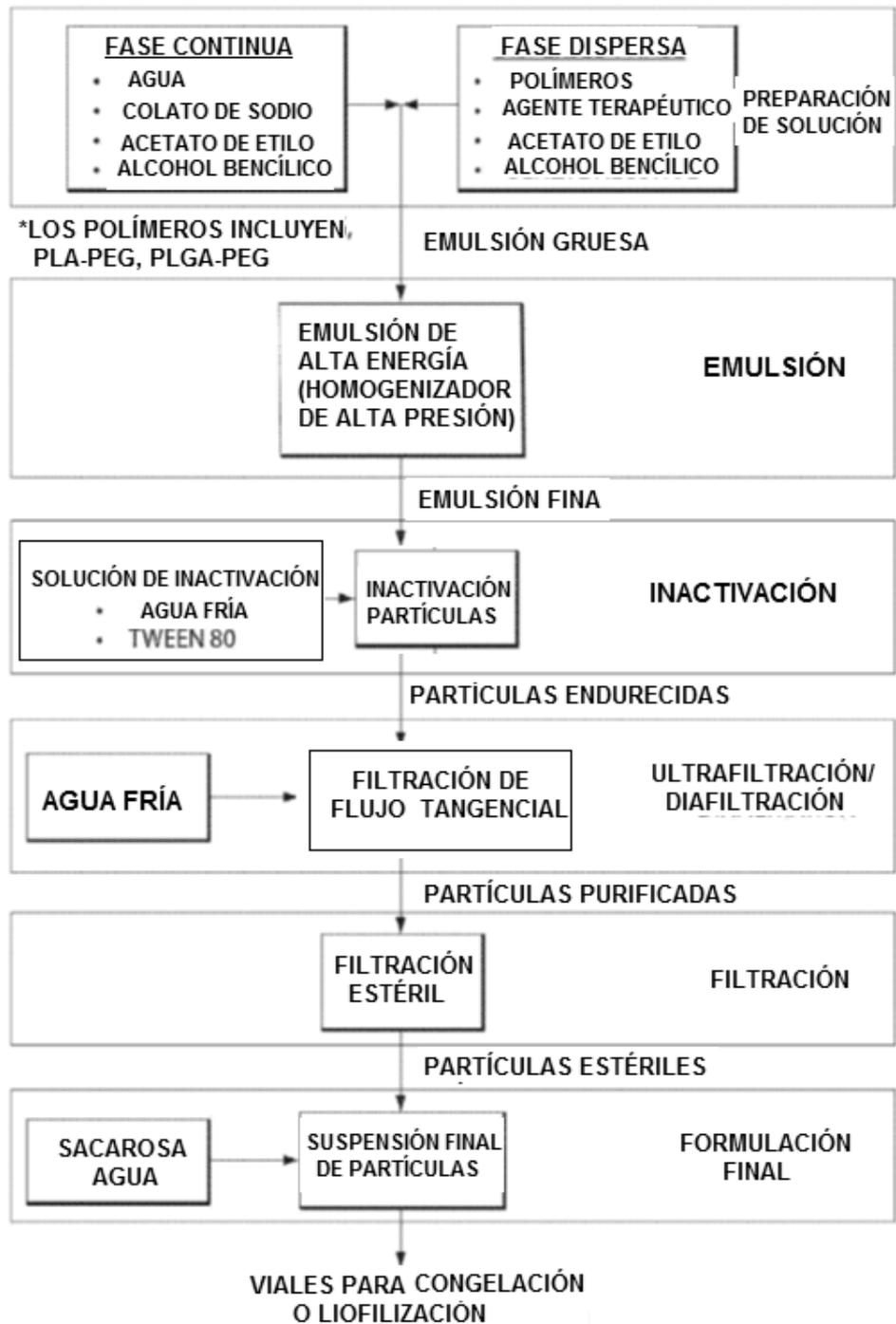


Fig. 1

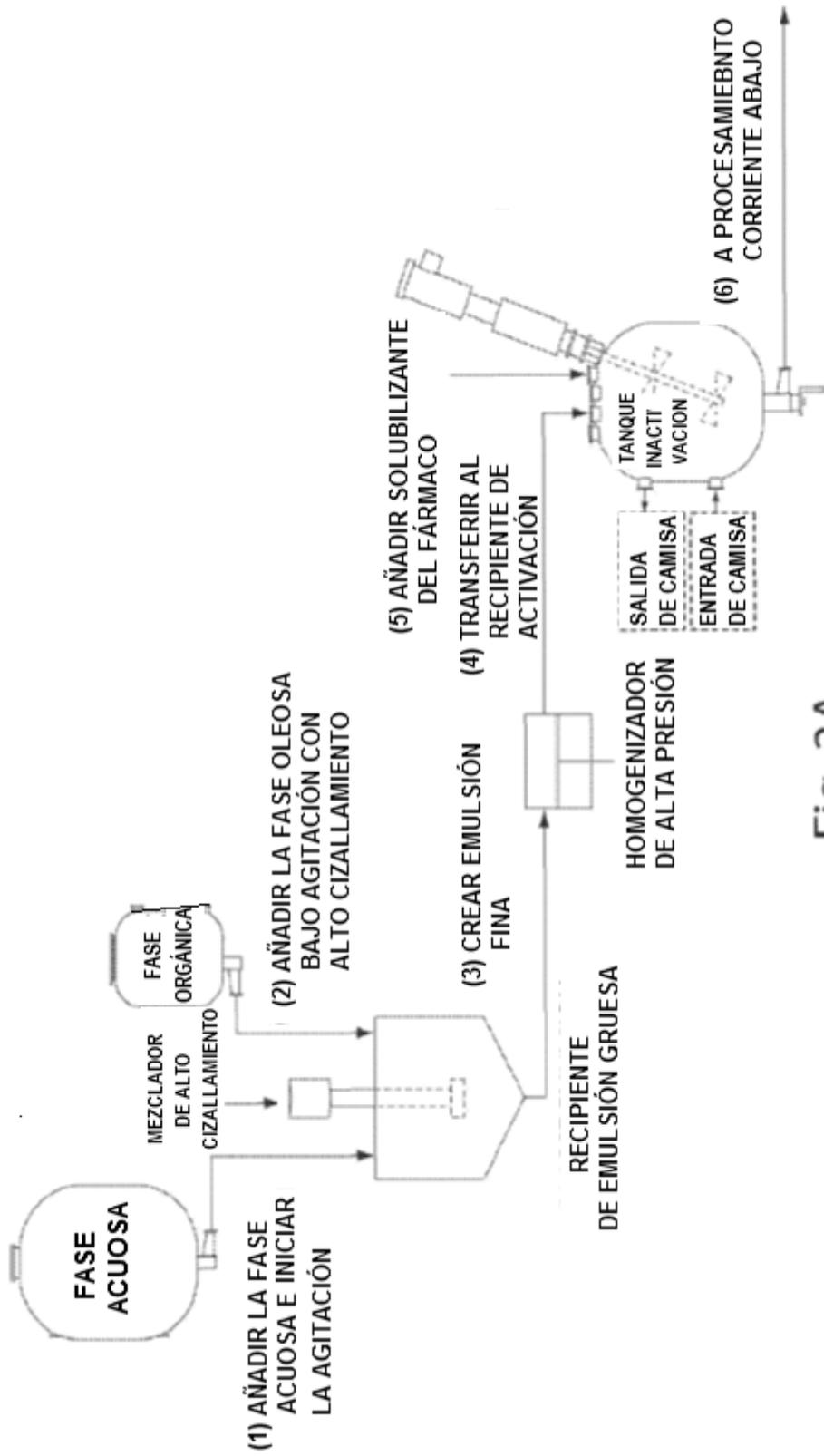


Fig. 2A

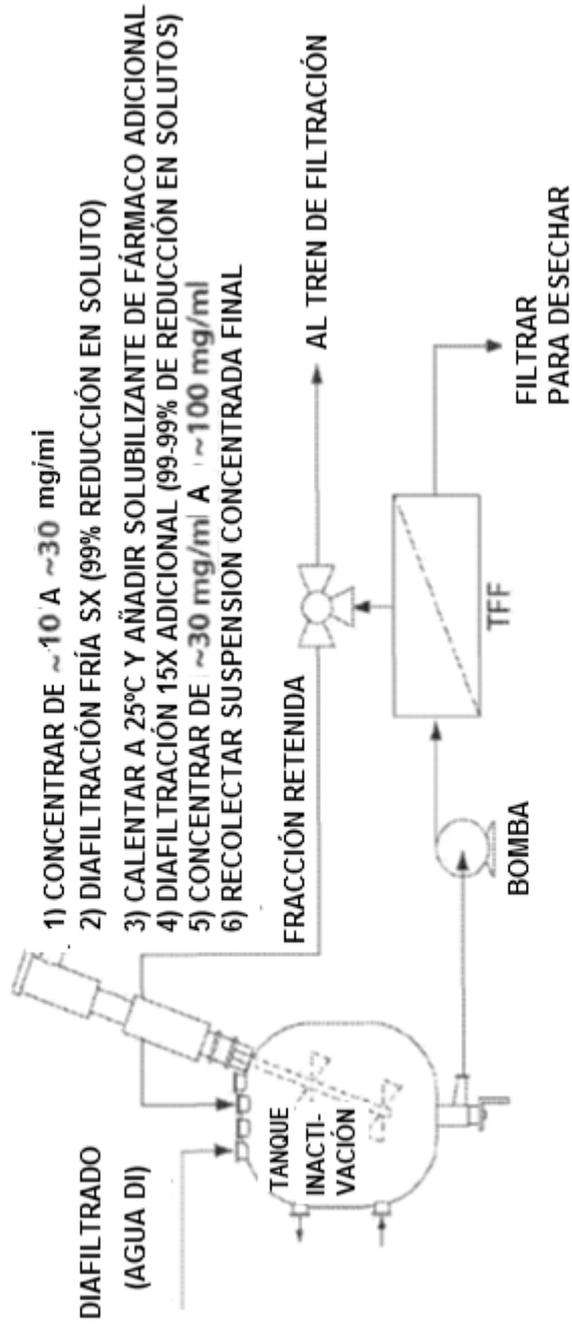


Fig. 2B

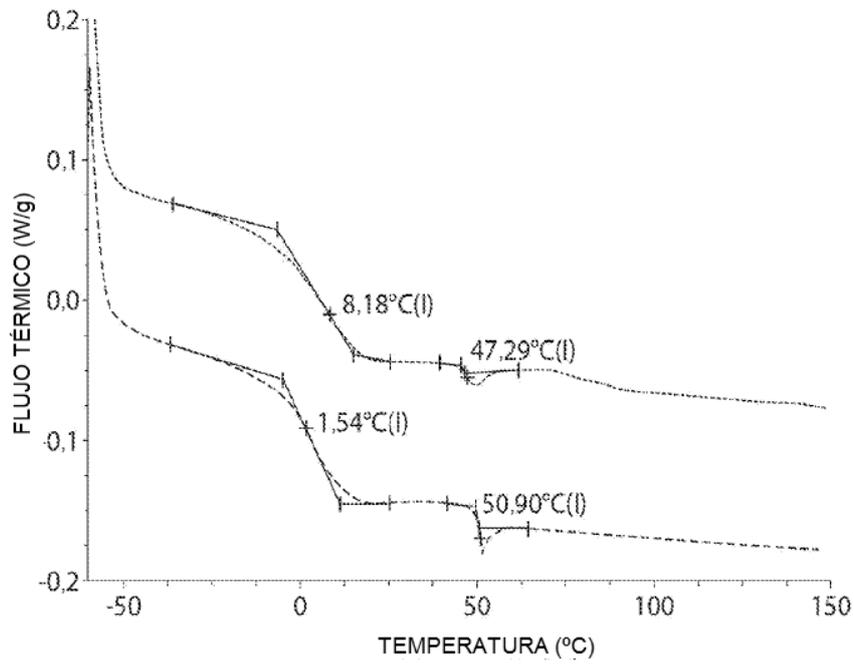


Fig. 3

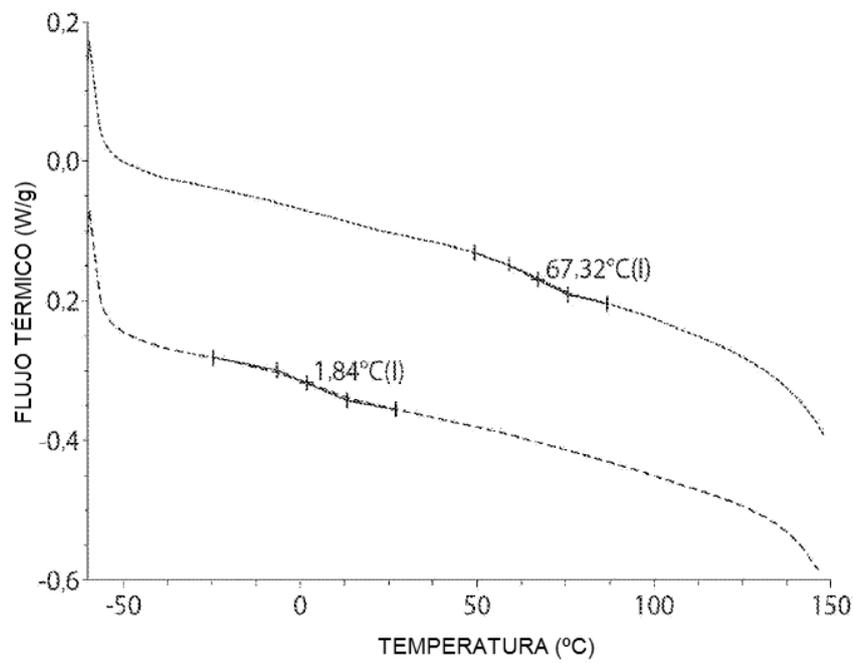


Fig. 4A

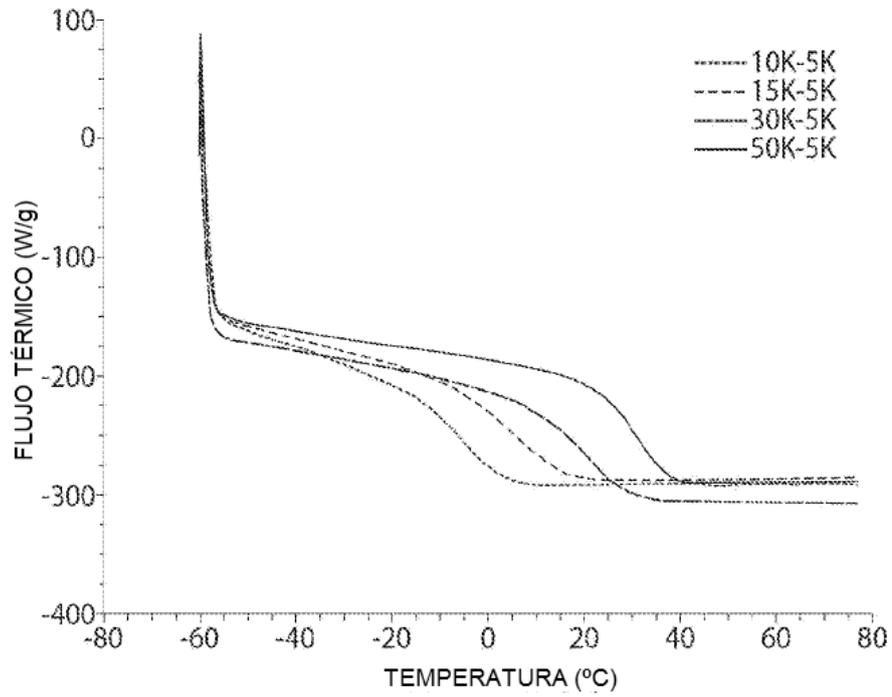


Fig. 4B

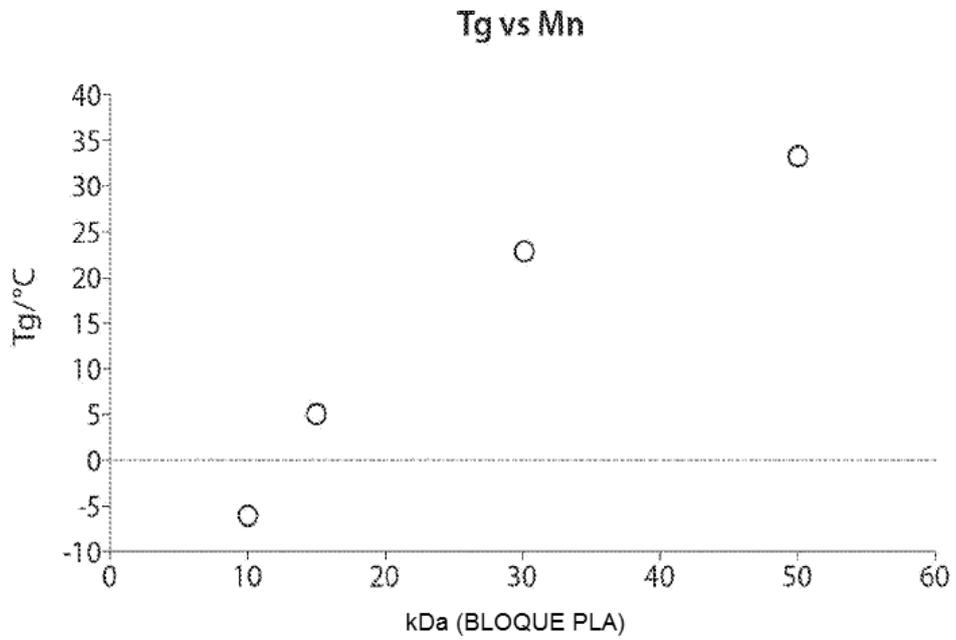


Fig. 4C

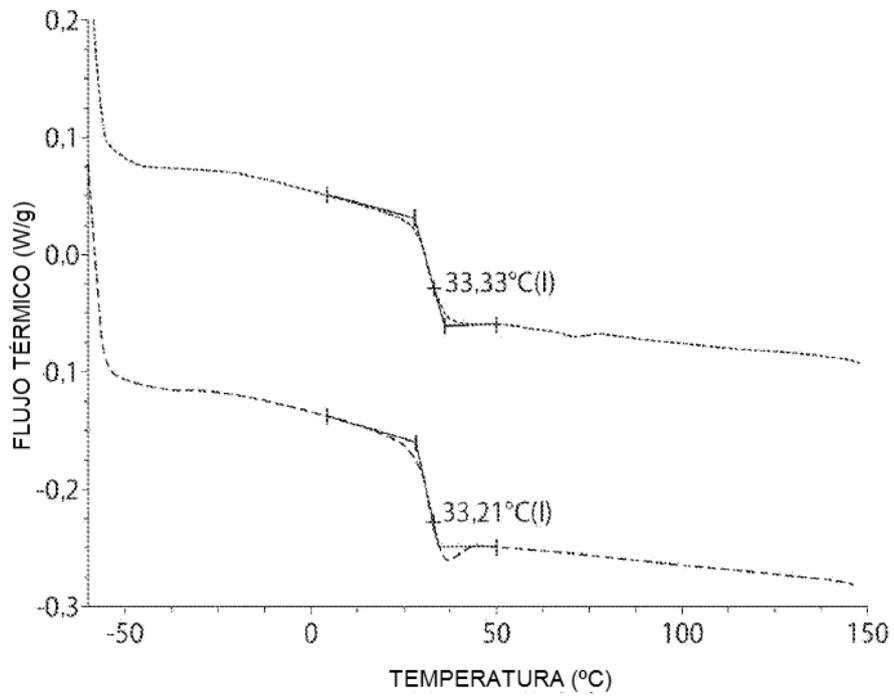


Fig. 5

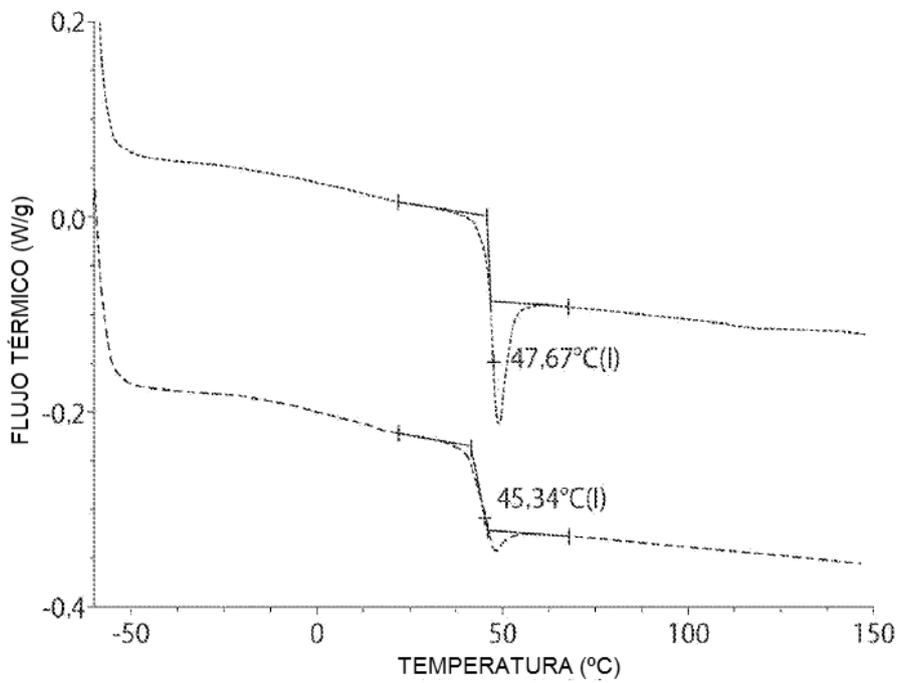


Fig. 6A

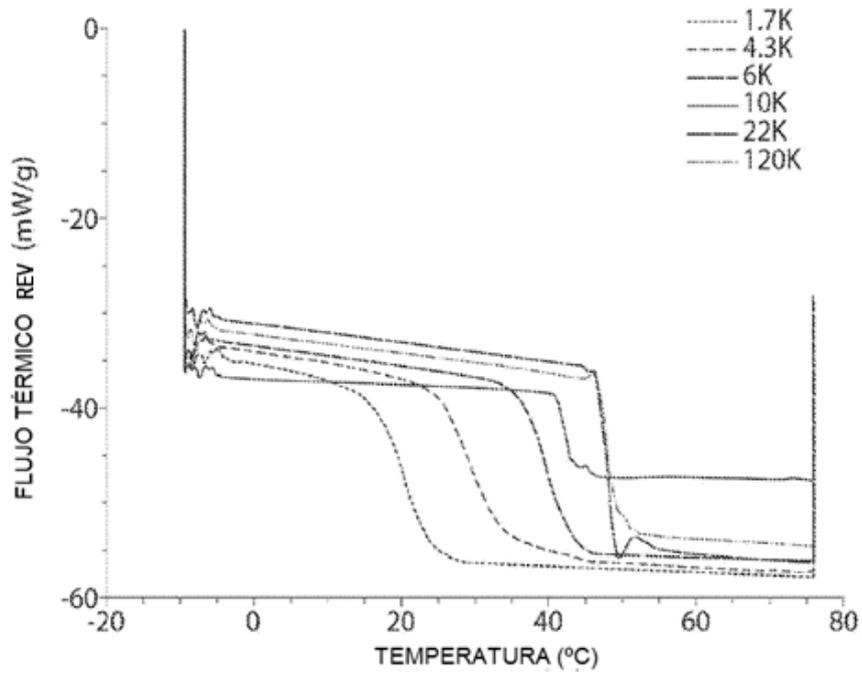


Fig. 6B

Tg vs Mn

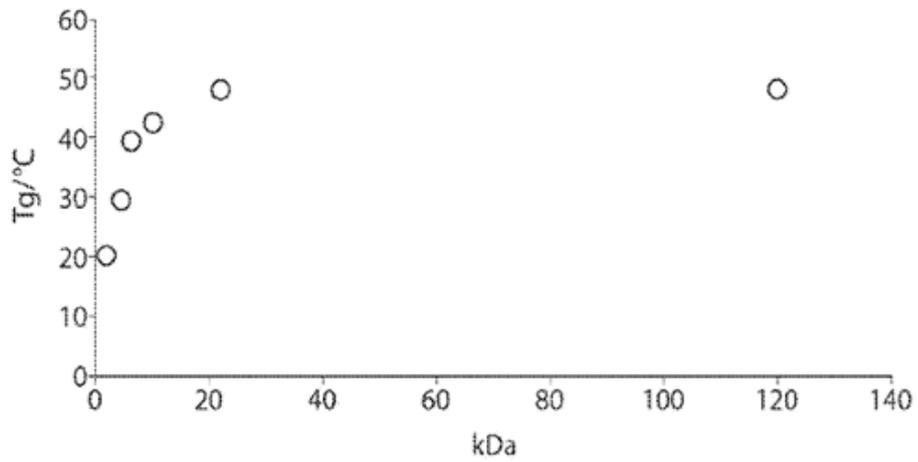


Fig. 6C

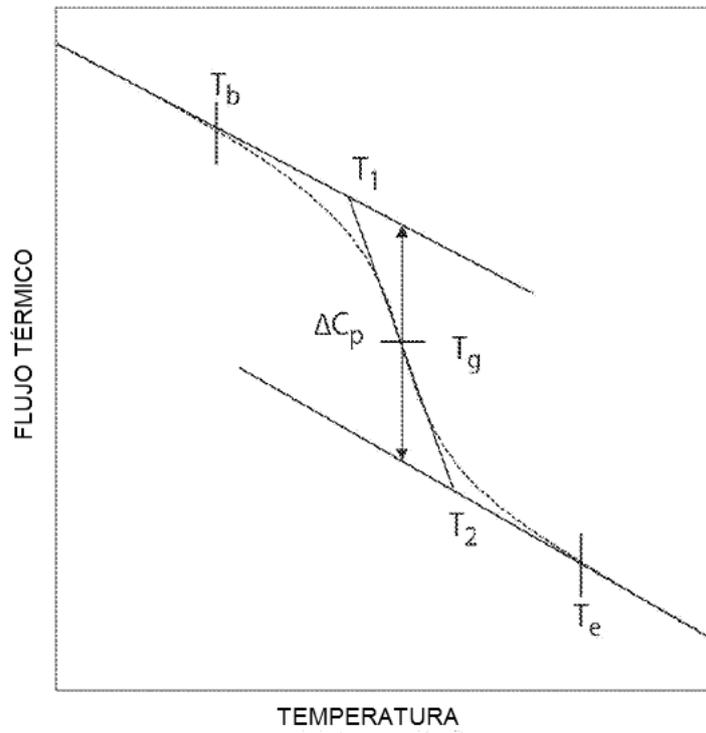


Fig. 7

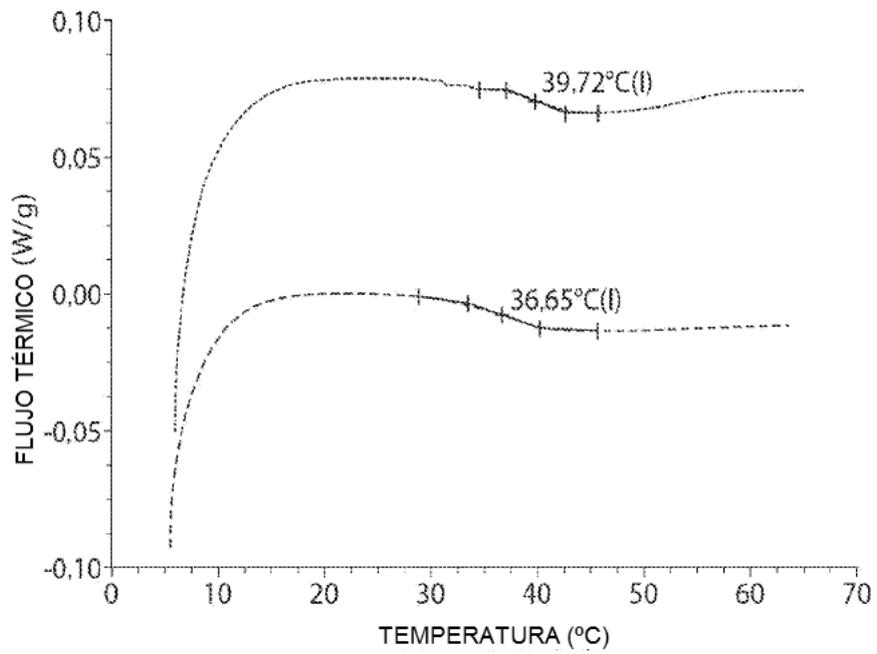


Fig. 8

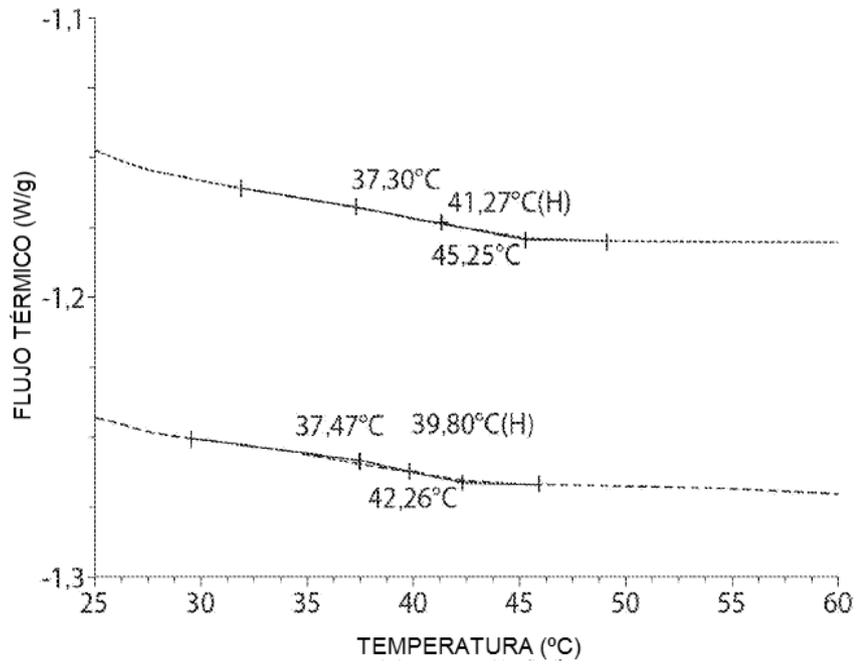


Fig. 9

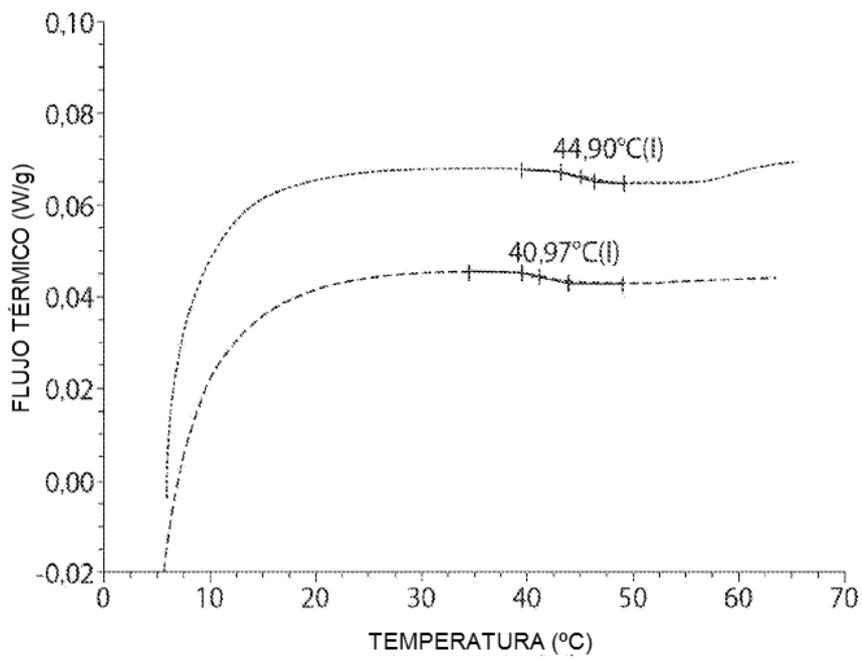


Fig. 10

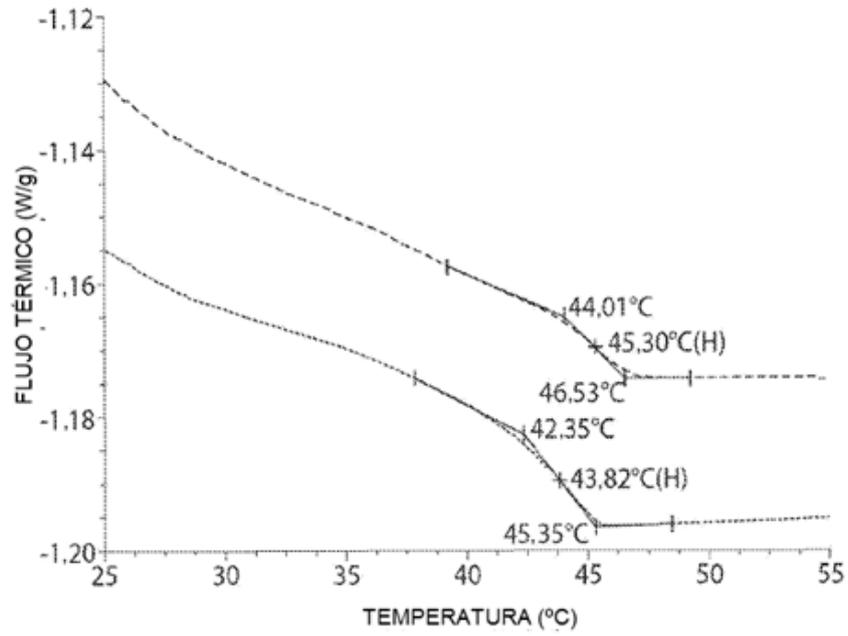


Fig. 11A

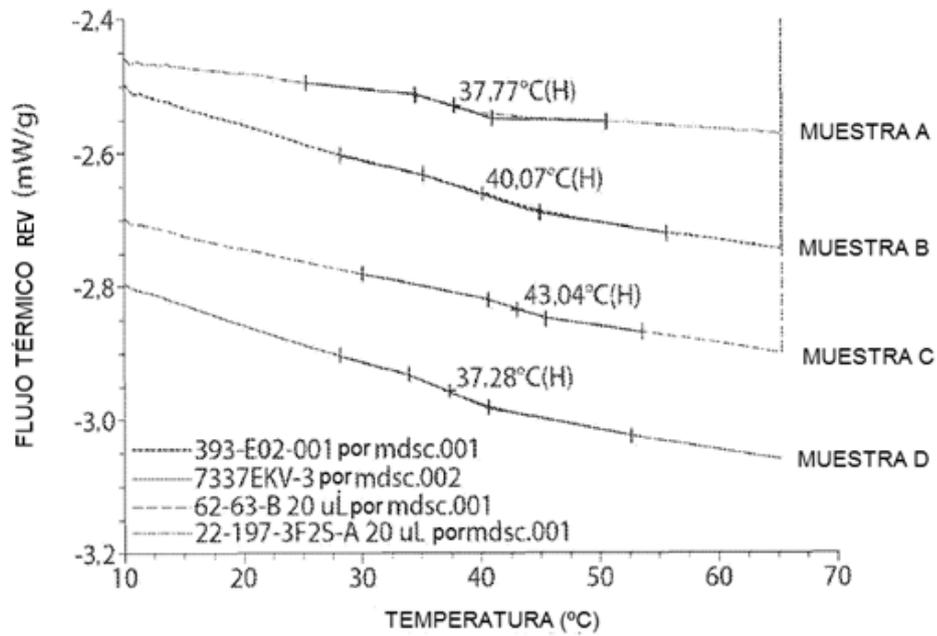


Fig. 11B

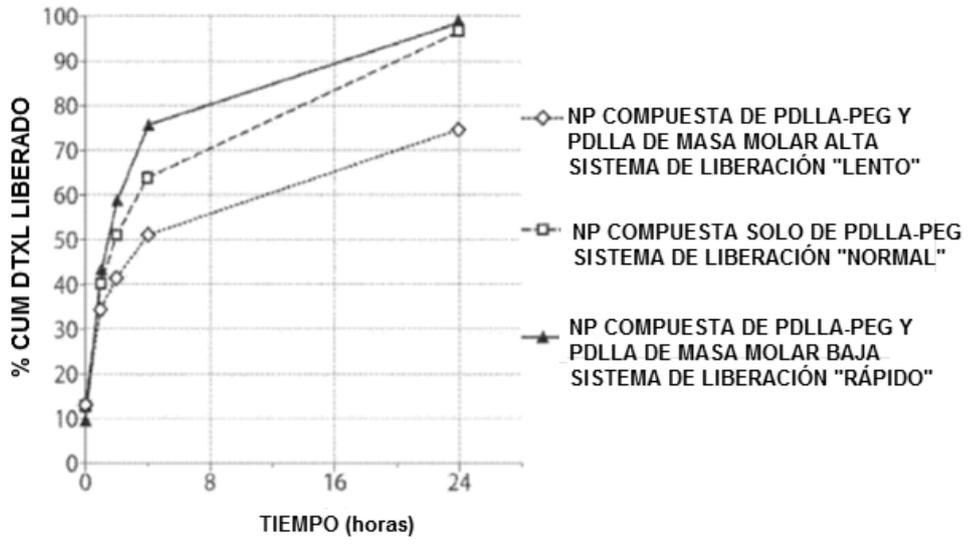


Fig. 12

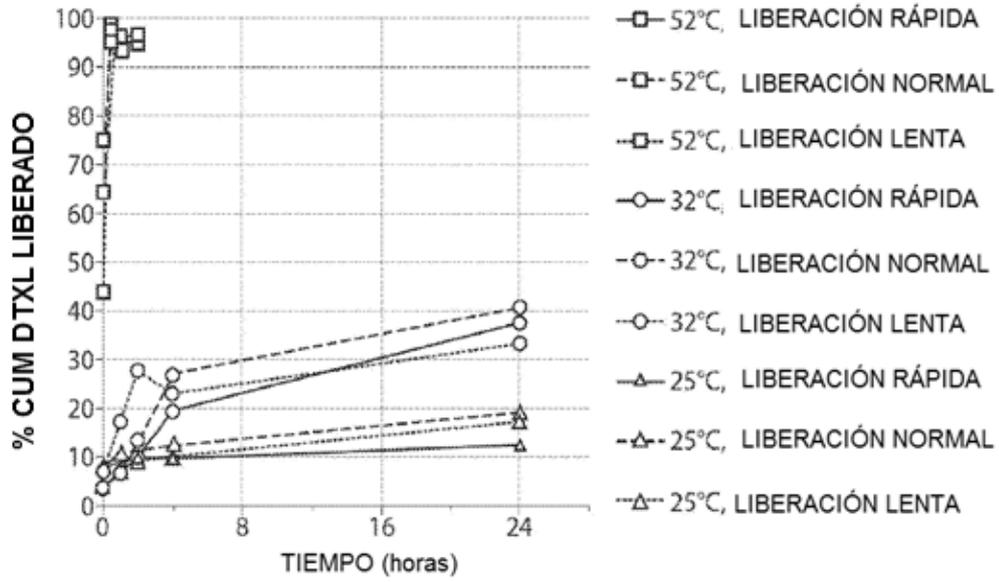


Fig. 13

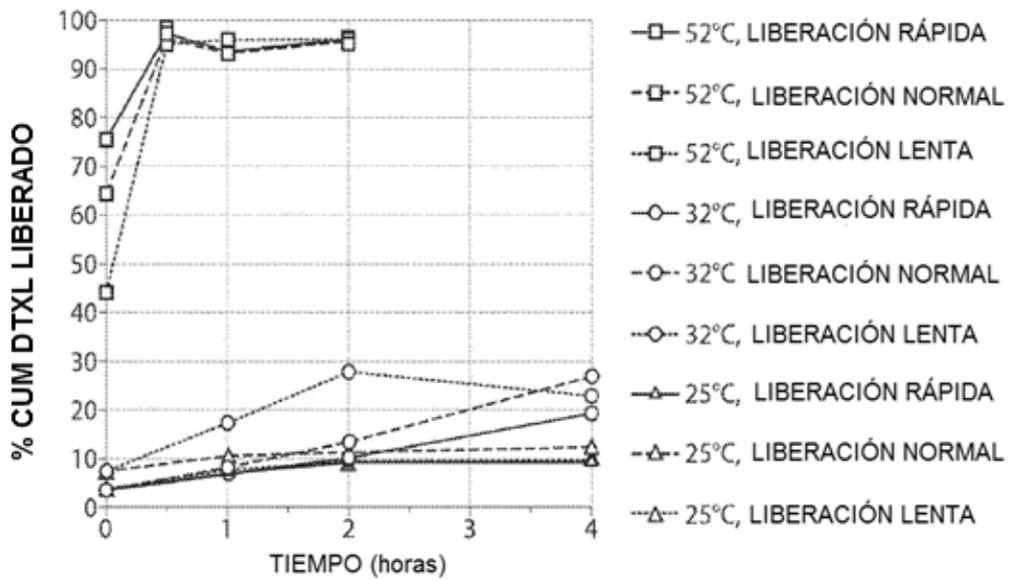


Fig. 14

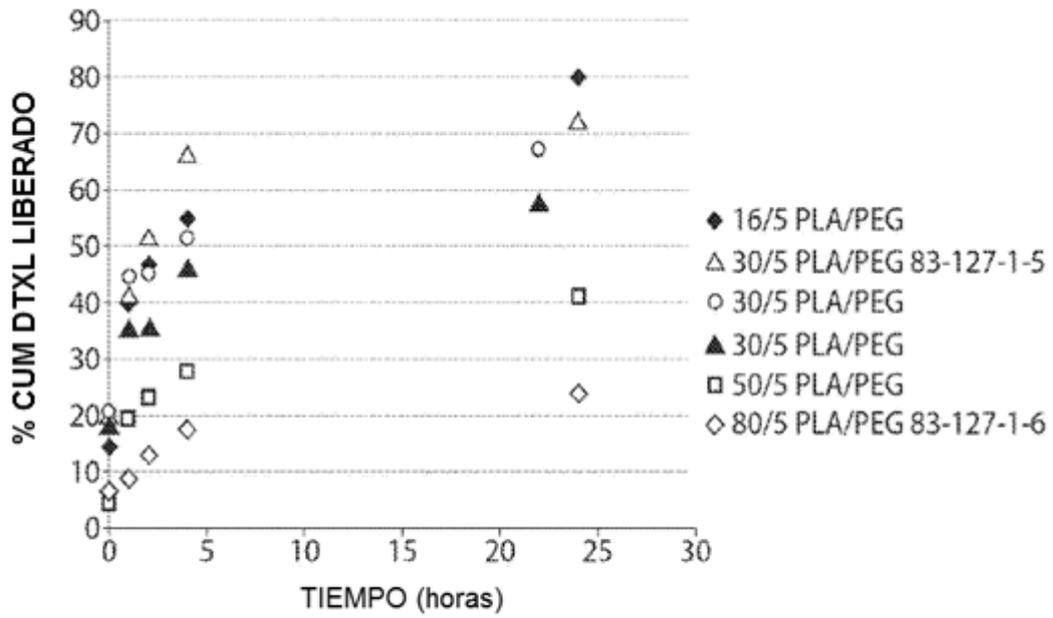


Fig. 15

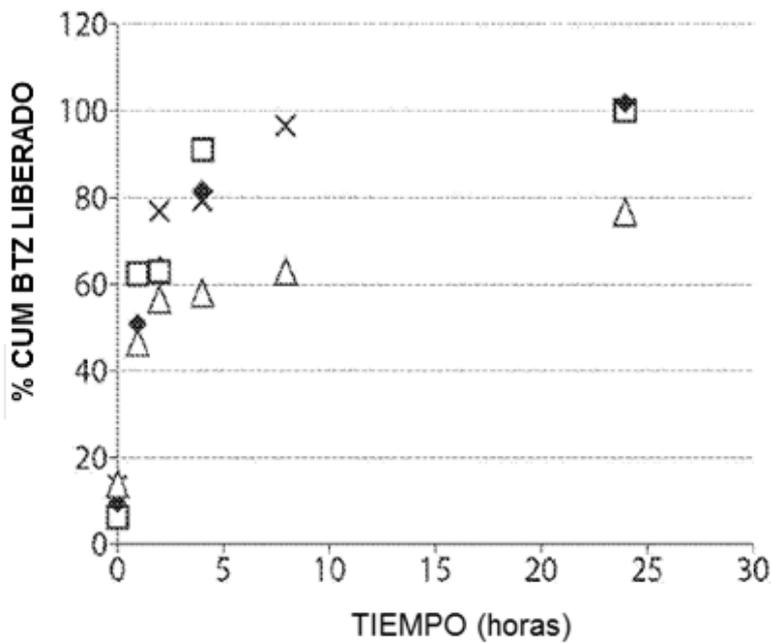


Fig. 16

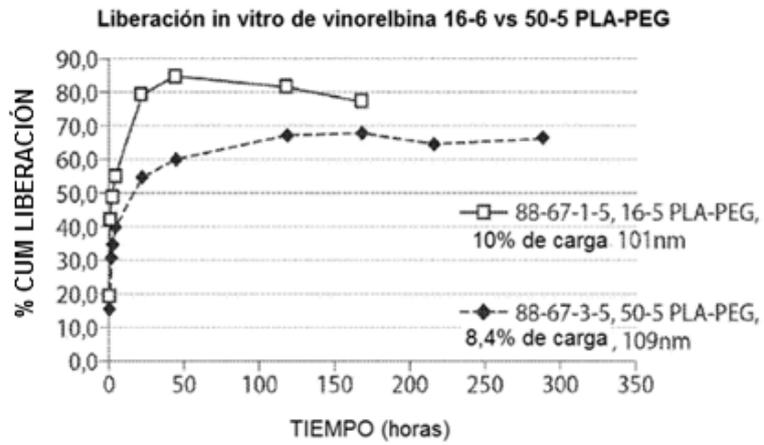


Fig. 17

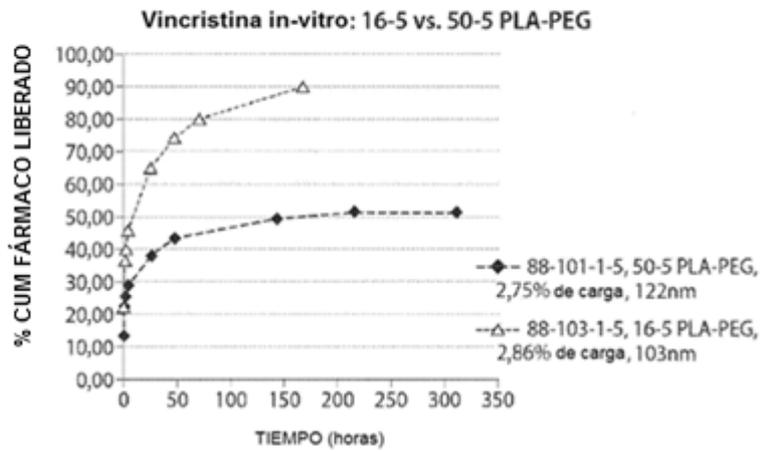


Fig. 18

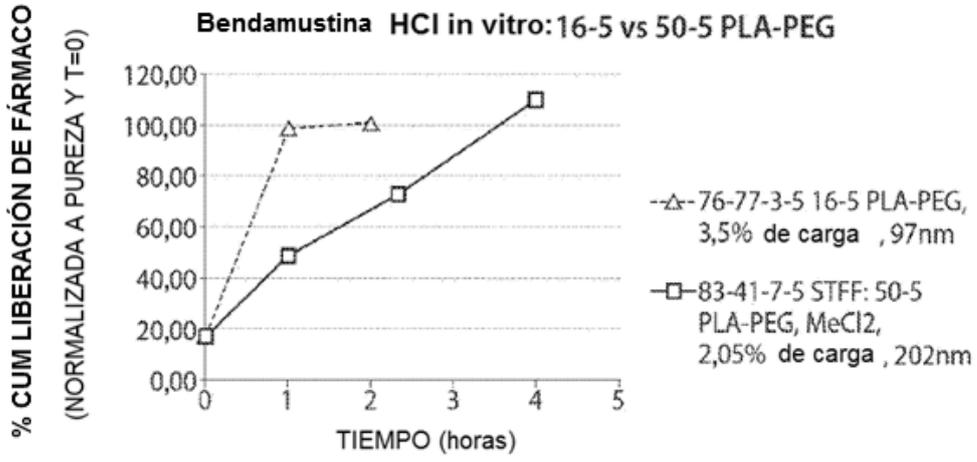


Fig. 19

Liberación in vitro: Nanopartículas de EpoB

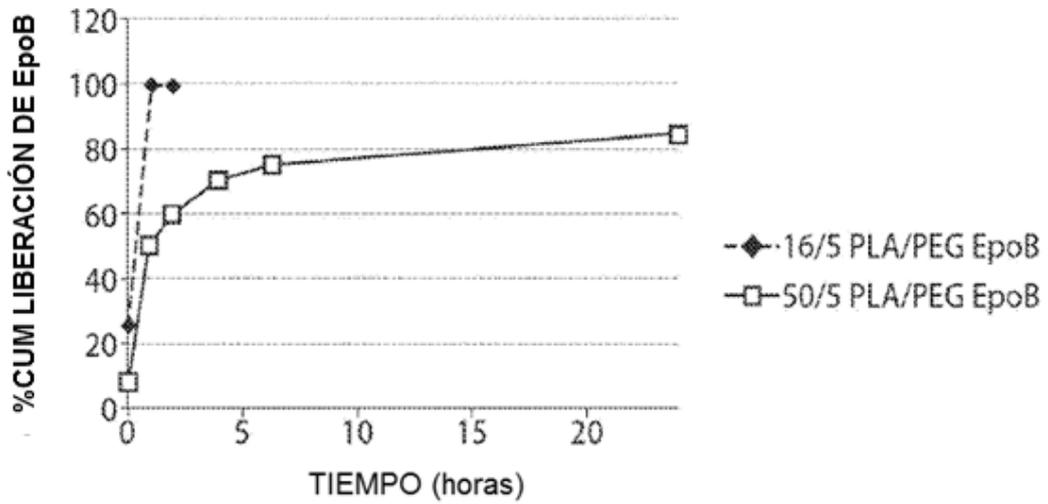


Fig. 20

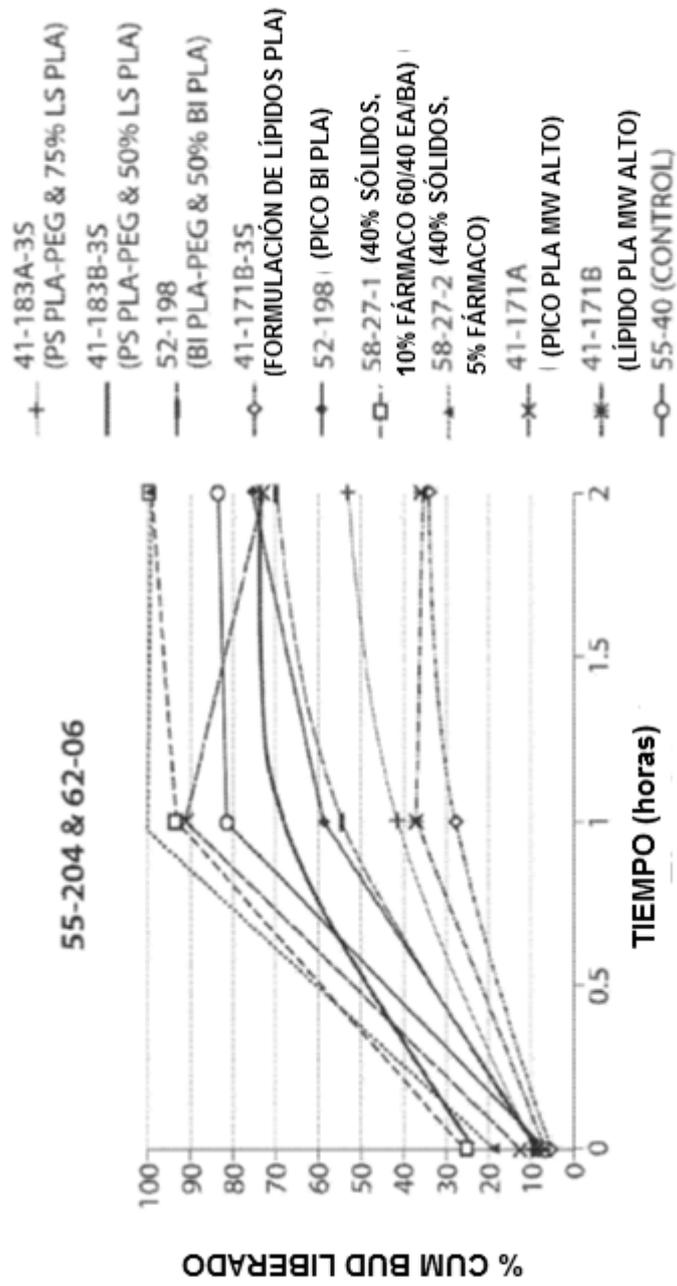


Fig. 21

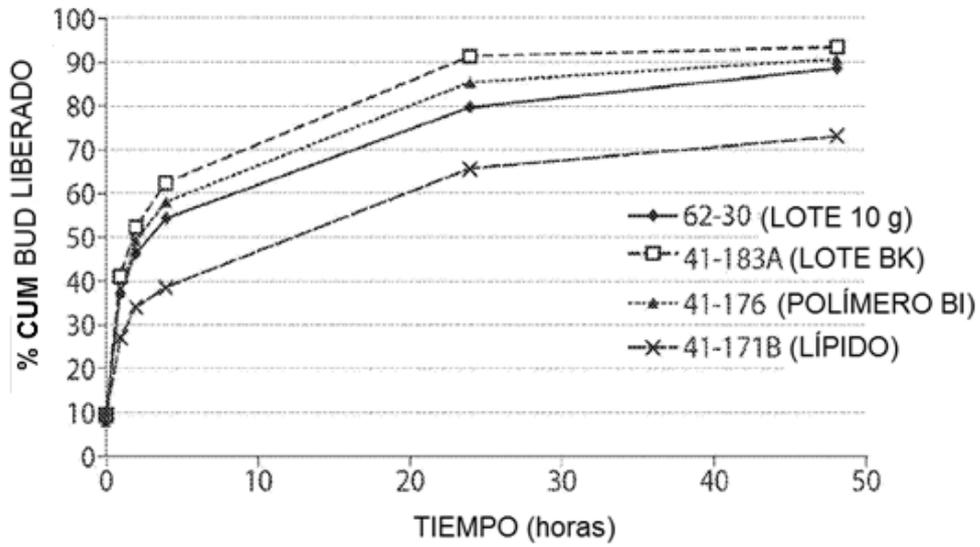


Fig. 22

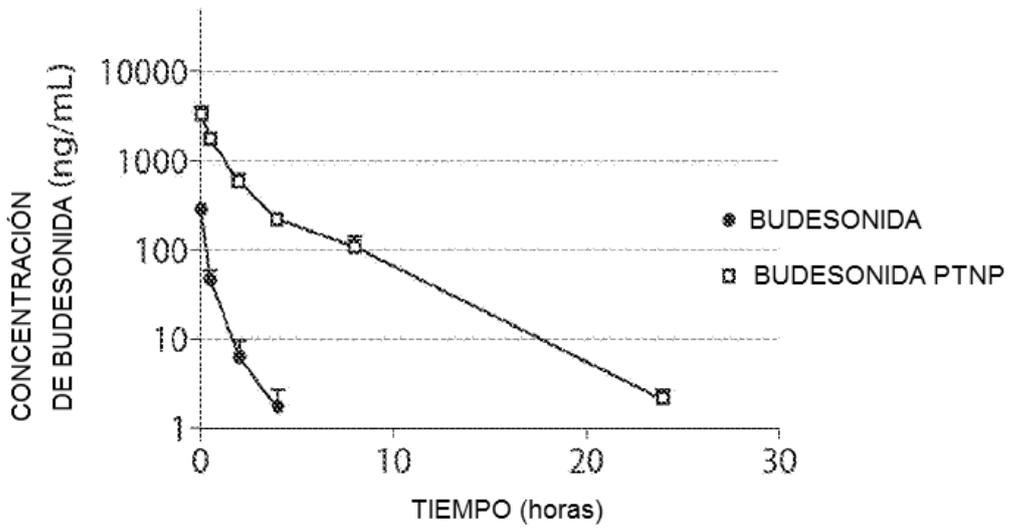


Fig. 23

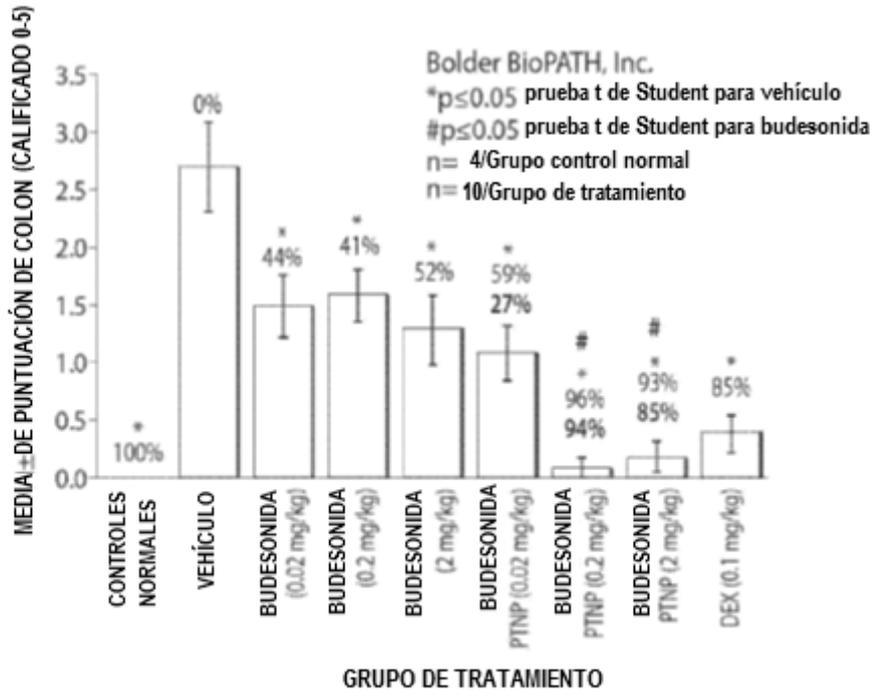


Fig. 24

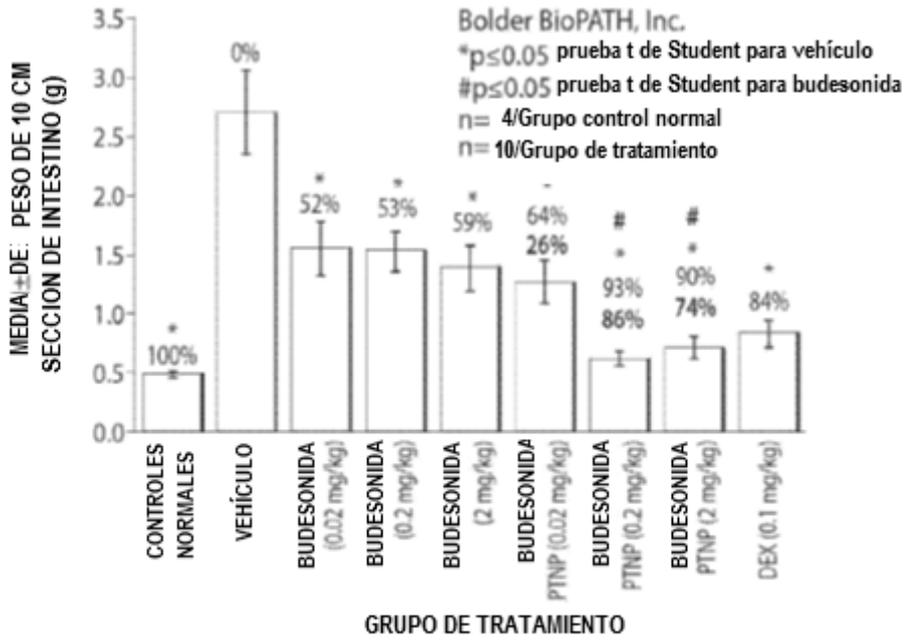


Fig. 25

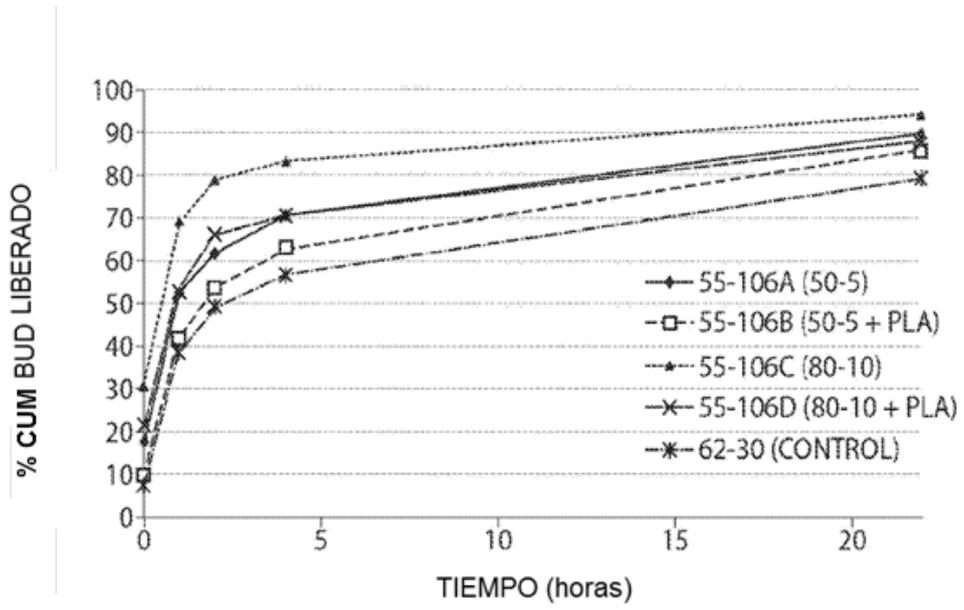


Fig. 26