



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 232 287**

② Número de solicitud: 200301570

⑤ Int. Cl.:
A61K 9/51 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.07.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2005**

Fecha de la concesión: **04.09.2006**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2006**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2006

⑰ Titular/es:
ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES, S.L.
Barcelona Science Park
c/ Baldri i Reixac, 10-12
08028 Barcelona, ES

⑱ Inventor/es: **Alonso Fernández, María José;**
Sánchez Barreiro, Alejandro y
Csaba, Noemí

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉑ Título: **Nanopartículas de derivados polioxietilenados.**

㉒ Resumen:

Nanopartículas de derivados polioxietilenados, de tamaño inferior a 1 micra, para la administración de ingredientes farmacéuticamente o cosméticamente activos, que comprenden un polímero biodegradable, un copolímero en bloque derivado del polioxietileno y al menos un ingrediente farmacéutica o cosméticamente activo, un procedimiento de obtención de dichas nanopartículas y composiciones que las contienen.

ES 2 232 287 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de derivados polioxietilenados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas (tamaño inferior a 1 μm) con una nueva composición, que son adecuadas para la administración de moléculas activas. La nueva composición comprende dos polímeros: un polímero biodegradable y un copolímero bloque derivado del polioxietileno.

10 **Antecedentes de la invención**

Las nanopartículas poliméricas están siendo objeto de especial atención debido a su interés para mejorar la estabilidad y promover el transporte y liberación controlada de fármacos a determinadas regiones del organismo. Los polímeros biodegradables más utilizados para su formación son los derivados del ácido poliláctico (PLA) y sus copolímeros con el ácido glicólico (PLGA) debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad e inocuidad (Johansen *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2000, 50, 129-146). Otros polímeros biodegradables que también ofrecen un futuro prometedor en esta línea son poliésteres como la poly(ϵ -caprolactona) (Losa *et al.*, Pharm. Res., 1993, 10,1, 80-87) y los polianhidridos (Mathiowitz *et al.*, Nature, 1997, 386, 410-414).

Las micro y nanopartículas de PLA y PLGA han sido extensivamente estudiadas para la encapsulación y liberación de un amplio número de moléculas terapéuticas (Quintanar-Guerrero *et al.*, Drug Dev. Ind. Pharm., 1998, 24 (12),1113-1128, Sánchez *et al.*, Int.J. Pharm., 1993, 99, 263-273, Sturesson *et al.*, J. Control. Rel., 1999, 59, : 377-389, Hsu *et al.*, J. Drug Targ., 7 (4), 313-323). Una característica destacable de estas partículas reside en el hecho de que su capacidad para controlar la liberación de moléculas activas depende de su perfil de degradación. De este modo, un control en la velocidad de degradación del polímero tiene una repercusión directa en el control de la liberación de la molécula activa asociada al mismo. Es sabido que la degradación de los poliésteres conduce a la formación de oligómeros ácidos que pueden acumularse en el interior de las partículas causando así, una acidificación del entramado polimérico y con ello una reducción importante del pH interno de las partículas (Belbella *et al.*, Int. J. Pharm., 1996, 129, 95-102). Este microclima ácido causado por la acumulación de productos de degradación del polímero en el seno de las partículas tiene un efecto muy negativo en la estabilidad de la molécula activa incorporada en las mismas y representa una limitación en la utilización de estos sistemas poliméricos para la liberación controlada de macromoléculas como proteínas y plásmidos ADN (Zhu *et al.*, Nature Biotech., 18, 52-57).

Los poloxameros son copolímeros tribloque tipo polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (PEO-PPO-PEO) que, dependiendo de su relación PEO:PPO varían en sus características de peso molecular, hidrofobicidad, etc.. Las poloxaminas son copolímeros formados por 4 cadenas de PEO-PPO unidas por un puente de etilendiamina. Análogamente a los poloxameros, sus características pueden variar al cambiar la relación PEO-PPO.

Una de las aplicaciones que recientemente se ha propuesto para esta familia de o copolímeros derivados del polioxietileno es la de ser promotores del transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica (BBB) (Kabanov *et al.*, Adv. Drug. Deliv. Rev., 2003, 55, 151-164). Asimismo, estudios recientes han puesto de manifiesto el interés de los mismos en estudios de transfección de plásmidos ADN (Lemieux *et al.*, Gene Ther., 2000, 7, 986-991).

Por otro lado, los copolímeros bloque PEO:PPO han sido ampliamente estudiados como agentes de recubrimiento que permiten modificar la biodistribución de nanopartículas utilizadas como transportadores de fármacos. Así, son numerosos los trabajos que han puesto de manifiesto que el recubrimiento de nanopartículas con poloxameros y poloxaminas afecta a su biodistribución y, por tanto, a su capacidad para transportar fármacos a diferentes regiones del organismo (Moghimi *et al.*, FEBS Letters,1994, 344, 25-30, Hawley *et al.*, FEBS Letters, 1997, 400, 319-323).

Existen diversos documentos en los que se reivindica la utilización de los derivados PEO-PPO como agentes de recubrimiento de nanopartículas (WO96/20698 y US4904479). El objetivo ha sido el de prolongar el tiempo de circulación de las mismas tras su inyección intravenosa y modificar su perfil de biodistribución. En dichas composiciones el poloxamero/poloxamina no forma parte de la matriz polimérica constitutiva de las partículas sino que se encuentra adsorbido a nivel superficial. Por tanto, la cantidad de poloxamero/poloxamina adsorbida es limitada y su presencia no tiene implicaciones en la encapsulación o liberación controlada de la molécula activa encapsulada en las partículas, sino que su papel se limita a la modificación del perfil de biodistribución de las partículas.

Por otro lado, en otro documento, US5578325, se ha propuesto la idea de unir químicamente los citados copolímeros a poliésteres, formando así copolímeros multibloque. En estos casos el derivado polioxietilenado se encuentra unido covalentemente al poliéster, conduciendo así a la formación de un nuevo copolímero. Estos copolímeros permiten igualmente obtener nanopartículas recubiertas de PEO-PPO que ofrecen una larga permanencia en el torrente circulatorio tras su administración intravenosa.

Otra de las aplicaciones de que han sido objeto los copolímeros bloque PEO-PPO ha sido la estabilización de proteínas encapsuladas en partículas de PLGA y la modificación de su liberación a partir de las mismas. Así, en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, hemos podido comprobar que la incorporación de copolímeros bloque PEO-PPO, más concretamente poloxameros, en micro y nanopartículas de poliácido láctico/ácido glicólico

(PLGA) permite mejorar la estabilidad de las proteínas nanoencapsuladas en dichas partículas. En este estudio inicial, para la incorporación de poloxamero en las partículas hemos optado por el método de doble emulsión (agualdisolvente orgánico/agua), según el cual, el poloxamero hidrofílico se disuelve en la fase interna acuosa de la emulsión (Blanco *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 1997, 43, 287 - 294, Blanco *et al.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 1998, 45, 285-294). Este método permite la incorporación de cantidades muy pequeñas de poloxamero en relación a las cantidades de PLGA (normalmente la relación es 10:1 PLGA:poloxamer). Ello se debe a dos razones fundamentales: por un lado, el volumen de la fase interna acuosa en la que se disuelve el poloxamero es muy inferior al volumen de disolvente orgánico en el que se disuelve el polímero hidrofóbico (PLGA); por otro lado, el poloxamero tiende a difundir, durante el proceso de emulsificación, desde la fase interna acuosa hacia la fase externa acuosa, dificultando así la formación de las partículas. Esta dificultad ha podido solventarse haciendo uso de un método de microencapsulación anhidro, consistente en la formación de una emulsión de un disolvente orgánico (en el que se ha de disolver el PLGA y el poloxamero) en una fase externa oleosa en la que se disuelve un agente tensoactivo. Gracias a este método han podido incorporarse cantidades elevadas de poloxameros a micropartículas de PLGA (hasta del 50%) formando matrices mixtas PLGA: poloxamero. Este sistema microparticular mixto formado por una mezcla íntima de poloxamero y PLGA ha permitido la liberación controlada de proteínas (Tobío *et al.*, Pharm. Res., 1999, 16, 5, 682-688). Sin embargo, el inconveniente más notable de este método reside en la dificultad para obtener partículas nanométricas, siendo el tamaño medio de esas poblaciones de partículas superiores a 1 micra (1000 nanómetros). Además, dada la necesidad de utilizar aceites como fase externa de la emulsión, el aislamiento de las microsferas se hace muy laborioso y es necesaria la utilización de importantes cantidades de disolventes orgánicos para conseguir la eliminación del aceite. Por tanto, hasta el momento actual no ha sido descrito ningún procedimiento que permita la incorporación de elevadas cantidades de poloxamero en nanopartículas mixtas de poloxamero: PLGA.

La primera referencia encontrada relativa a la utilización de poloxameros en la formación de matrices mixtas con poliésteres basadas en la unión física de ambos polímeros aparece descrita en la publicación US5330768. En dicho documento, se propone la utilización de dichas mezclas a fin de lograr una modificación en la liberación de la molécula activa incorporada en estos sistemas. En él se hace referencia a la formación de películas mediante codisolución de ambos polímeros en un disolvente orgánico común y posterior evaporación del disolvente o mediante la fusión conjunta de ambos polímeros y también a la formación de micropartículas mediante el método de doble emulsión (agua/disolvente orgánico/agua); sin embargo, no se menciona la formación de nanopartículas. Ha de destacarse el hecho de que el citado procedimiento de formación de partículas en fase externa acuosa, permite únicamente la incorporación de cantidades limitadas de poloxameros hidrofílicos debido a su lógica tendencia a difundir a la fase externa acuosa; este hecho ha podido ser constatado en nuestros estudios anteriores (Blanco *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 1997, 43, 287-294, Blanco *et al.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 1998, 45, 285-294). Asimismo, el documento US5330768 no menciona la utilización de poloxameros lipofílicos ni de poloxaminas en la formación de las citadas mezclas.

El primer documento encontrado que hace referencia a la formación de un sistema microparticular mixto formado por una mezcla íntima de poloxamero y PLGA destinado a mejorar la estabilidad de proteínas microencapsuladas, permitiendo además su liberación controlada, es el publicado por Tobío *et al.* (Pharm. Res., 1999, 16, 5, 682-688). Más recientemente, el documento US6465425 describe igualmente la formación de micropartículas biodegradables conteniendo poloxamero con la misma finalidad. Asimismo, en dicha composición se incorporan, con la misma finalidad, un excipiente de tipo ácido y al menos un polisacárido. Según dicho documento, la cantidad de poloxamero que se puede incluir en esta composición puede variar entre un 1 - 40% con respecto al peso total de la composición. La forma de presentación de esta composición es la de films, obtenidos por simple evaporación del disolvente, o bien, de micropartículas obtenidas por atomización. Sin embargo, no se hace referencia alguna a la formación de nanopartículas, lo cual se entiende si tenemos en cuenta que la técnica de atomización no permite obtener partículas de un tamaño tan reducido como las nanopartículas.

En la misma línea, con al finalidad de mejorar la estabilidad de proteínas destaca el documento presentado por Schwendeman *et al.* (US2002/0009493), el cual describe la utilización de poloxameros hidrofílicos de peso molecular entre 500 y 30.000 Da, como agentes formadores de poros en sistemas elaborados a partir de poliésteres. En dicho documento se reivindica la presentación de estas composiciones en forma de cilindros o de micropartículas, con un tamaño comprendido entre 10-100 μm . Estas partículas se obtienen mediante la técnica de doble emulsión en fase externa acuosa, la cual permite únicamente la incorporación de cantidades pequeñas de poloxameros hidrofílicos, como se señaló en estudios anteriores (Blanco *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 1997, 43, 287-294; Blanco *et al.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 1998, 45, 285-294), o alternativamente, mediante la técnica de emulsificación de disolvente orgánico/aceite, la cual, como se ha indicado anteriormente (Tobío *et al.* Pharm. Res., 1999, 16, 5, 682-688), no permite la obtención de nanopartículas.

En relación con los documentos que hacen referencia explícita a la formación de nanopartículas que contienen poloxameros cabe citar el documento US5962566. No obstante, este documento señala la incorporación de colesterol como ingrediente indispensable para la formación de las nanopartículas. El método de formación indica además la necesidad de fundir el conjunto de los materiales y su posterior dispersión en una fase acuosa.

Igualmente cabe citar un documento que describe la formación de nanopartículas que incorporan en su estructura poloxameros y poloxaminas, además de un agente lipídico estabilizante (US20030059465). Estas nanopartículas van dirigidas a la liberación del agente citostático camptotecina y se obtienen mediante un procedimiento de hidratación de lípidos previamente liofilizados. Aunque en dicho documento se reivindica la posible incorporación de poliésteres

tales como el PLGA, lo cierto es que la técnica descrita no es aplicable a este tipo de polímeros. En cualquier caso, la incorporación de lípidos en la estructura se muestra como un elemento esencial de la composición nanoparticular.

5 Como consecuencia de la revisión de los documentos anteriores, cabe destacar que a pesar del importante número de documentos que hacen referencia a la formación de partículas de PLGA y poloxamero, lo cierto es que ninguno de los documentos citados describe la formación de matrices mixtas que contengan elevadas cantidades de poloxameros y poloxaminas, con diferentes características de hidrofilia/lipofilia y que se presenten bajo la forma nanoparticular. Este último aspecto es de importancia crítica ya que las técnicas de microencapsulación destinadas a la formación de micropartículas difieren generalmente de las nanotecnologías aplicadas a la formación de nanopartículas. Asimismo, conviene destacar el hecho de que los documentos publicados relacionados con la obtención de nanopartículas, utilizan únicamente poloxameros hidrofílicos incorporados en muy bajas proporciones en el sistema nanoparticular.

Descripción de la invención

15 La presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden un polímero biodegradable, preferentemente un poliéster y un copolímero bloque derivado del polioxietileno, preferentemente poloxamero y poloxamina. Asimismo, la presente invención se refiere a un método de preparación que permite la incorporación de porcentajes altos de poloxameros y poloxaminas en nanopartículas, siendo la relación polímero biodegradable: derivado polioxietileno entre 1:0,1 y 1:3.

20 Por lo tanto, según un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de nanopartículas de tamaño inferior a $1\ \mu\text{m}$, para la administración de ingredientes activos, que comprende las etapas de:

25 a) disolver un polímero biodegradable junto con un copolímero bloque derivado del polioxietileno en un disolvente orgánico, estando la relación en peso polímero biodegradable:copolímero bloque entre 1:0,1 y 1:3;

b) añadir, bajo agitación, la disolución obtenida a una fase polar, en la cual el polímero biodegradable presenta una baja solubilidad, precipitando los polímeros y formándose las nanopartículas;

30 c) eliminar el disolvente orgánico; d) aislar las partículas. El ingrediente activo puede disolverse directamente en el disolvente orgánico no polar (moléculas lipofílicas) o puede disolverse previamente en un volumen pequeño de fase acuosa (moléculas hidrosolubles) y luego dispersarse en el disolvente orgánico, antes o después de la etapa a).

35 De forma preferida, el disolvente orgánico en a) será un disolvente no polar.

Según una forma de realización preferida, la preparación de las formulaciones de nanopartículas de mezcla íntima puede incluir adicionalmente una etapa de liofilización. En forma liofilizada, las nanopartículas pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo y ser fácilmente regeneradas, simplemente añadiendo un volumen de agua óptimo. La liofilización de las nanopartículas ha sido optimizada con la incorporación de un excipiente crioprotector (glucosa o trehalosa) en el medio de suspensión de las formulaciones.

45 Según otra forma de realización preferida, en el procedimiento anterior el polímero biodegradable es un poliéster, el cual se selecciona del grupo de poliésteres como el ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico y sus copolímeros, policaprolactona o del grupo de los polianhídridos. Para la preparación de las nanopartículas de mezcla íntima se ha utilizado el polímero ácido poliláctico-co-glicólico 50:50 Resomer[®] RG 503 Mw: 35000 (Boehringer Ingelheim).

Según otras formas de realización preferida, el copolímero bloque se selecciona de poloxameros y poloxaminas.

50 Los poloxameros son copolímeros tribloque tipo polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (PEO-PPO-PEO) que, dependiendo de su relación PEO:PPO varían en sus características de peso molecular, hidrofobicidad, etc. De forma preferida, los poloxameros empleados tendrán un peso molecular comprendido entre 1.000 y 25.000 Daltons. Estos polímeros pueden ser obtenidos de BASF Corporation bajo el nombre comercial Pluronic.TM. Para la preparación de las nanopartículas de mezcla íntima hemos utilizado los siguientes poloxameros: Pluronic.TM F68 con peso molecular 8350 y HLB=29, Pluronic.TM con peso molecular 4400 y HLB=1.

55 Las poloxaminas son copolímeros formados por 4 cadenas de PEO-PPO unidas por un puente de etilendiamina. Análogamente a los poloxameros, sus características pueden variar al cambiar la relación PEO-PPO. De forma preferida, la poloxaminas empleadas presentarán un peso molecular comprendido entre 1.000 y 25.000 Daltons. Estos polímeros pueden ser obtenidos de BASF Corporation bajo el nombre comercial Tetronic.TM. Para la preparación de las nanopartículas de mezcla íntima hemos utilizado las siguientes poloxaminas: Tetronic.TM 908 con peso molecular 25000 y HLB=30,5, Tetronic.TM 904 con peso molecular 6700 y HLB=14,5, Tetronic.TM 901 con peso molecular 4700 y HLB=2,5.

60 Según otra forma de realización preferida, la proporción en peso de polímero biodegradable está entre 1:1 y 1:3.

65 Según un segundo aspecto de la presente invención, ésta se refiere a nanopartículas obtenidas según el procedimiento anteriormente descrito, tanto liofilizadas como no liofilizadas.

Estas nanopartículas ofrecen características innovadoras y distintivas dada su capacidad para la encapsulación y liberación controlada de moléculas activas muy delicadas, como son las proteínas y los plásmidos ADN. Además, debido a la presencia de importantes cantidades de poloxameros y poloxaminas en su composición, dichas nanopartículas pueden presentar un perfil de biodistribución diferenciado, en comparación a las partículas clásicas constituidas a partir de poliésteres.

Debido a su tamaño nanoparticular estos nuevos sistemas van a poder ser administrados al organismo humano por cualquier vía de administración, incluyendo la vía intravenosa, mientras que las micropartículas no pueden ser administradas por esta vía debido a la obstrucción que causarían en los capilares sanguíneos. Asimismo, existe abundante documentación que muestra que las nanopartículas son capaces de superar barreras biológicas (mucosas, epitelios) mientras que las micropartículas no lo son.

Las propiedades físico-químicas de las formulaciones de distinta composición y de diferente relación de polímeros han sido caracterizadas empleando las técnicas de espectroscopia de correlación de fotónica (PCS) y anemometría láser-Doppler. La morfología de las nanopartículas se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y RMN de ¹H. Estos estudios confirmaron la formación del sistema de mezcla íntima anteriormente descrita.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad de estas nanopartículas de mezcla íntima para la liberación de macromoléculas delicadas, hemos encapsulado el plásmido pEGFP-C1 (codificante una proteína fluorescente verde) en las diferentes formulaciones. Los resultados de estos estudios de liberación “*in vitro*” han evidenciado el potencial de las formulaciones como vehículos de liberación controlada durante tiempos extendidos.

La citotoxicidad de las nanopartículas de distintas composiciones, a diferentes concentraciones, ha sido ensayado en cultivos celulares con la prueba colorimétrica del MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) en la línea celular MCF-7 crecida en Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Se puede concluir que ninguna de las formulaciones produce efectos tóxicos en las células.

Según un tercer aspecto, la presente invención se refiere a composiciones, especialmente farmacéuticas y cosméticas, que incorporan las nanopartículas según la presente invención.

A continuación se explica más detalladamente la invención en base a una serie de ejemplos, sin carácter limitativo para el alcance de la invención.

Ejemplos

Descripción de las figuras

Fig 1: espectros de RMN de ¹H de las formulaciones de nanopartículas PLGA/Pluronic.TM F68 con diferentes relaciones de polímero

Fig 2: imágenes TEM de las formulación de nanopartículas PLGA/Pluronic.TM F68 con relación de polímero 1:1

Fig 3: espectros de RMN de ¹H de las formulaciones de nanopartículas PLGA/Tetronic.TM 908 con diferentes relaciones de polímero

Fig 4: imágenes TEM de formulaciones de nanopartículas PLGA/Tetronic.TM 908 con relación de polímero 1:1

Fig 5: tamaño de nanopartículas PLGA/poloxamero y PLGA/poloxamina en función de la relación PLGA/polímero y del tipo de poloxamero o poloxamina

Fig 6: carga superficial de las nanopartículas PLGA/poloxamero y PLGA/poloxamina en función de la relación PLGA/polímero y del tipo de poloxamero o poloxamina

Fig 7: efecto de los agentes crioprotectores en el tamaño de las nanopartículas PLGA/poloxamero liofilizadas

Fig 8: efecto de los agentes crioprotectores en el tamaño de las nanopartículas PLGA/poloxamero liofilizadas

Fig 9: perfil de liberación “*in vitro*” de ADN plasmídico encapsulado en las nanopartículas PLGA/F68, PLGA/L121, PLGA/T908 y PLGA/T904 con relación de polímeros 1:1

Fig 10: resultados del ensayo de citotoxicidad de las nanopartículas PLGA/F68, PLGA/L121, PLGA/T908 y PLGA/T904 con relación de polímeros 1:1 en el cultivo celular MCF-7

Ejemplo 1

Se prepararon nanopartículas de mezcla íntima con la técnica modificada de difusión del solvente anteriormente descrita. Más específicamente: se disolvieron 50 mg del ácido poliláctico-co-glicólico y 25, 50 ó 75 mg del poloxamero

ES 2 232 287 B1

Pluronic.TM F68 (HLB=29) en 2 ml de diclorometano y esta solución orgánica se mezcló durante 30 s mediante vortex (2400 min⁻¹, Heidolph) con un pequeño volumen de fase acuosa. La emulsión así obtenida se añadió a 25 ml de etanol bajo agitación magnética moderada. La formulación se diluyó con 25 ml de agua y la agitación se mantuvo durante 10 min. más. Después de la evaporación del solvente a 30°C y en vacío (Rotavapor, Büchi R-114), las nanopartículas se recogieron y se concentraron en medio acuoso. Opcionalmente, para su posterior análisis las nanopartículas se centrifugaron (1 h, 8000xg, 15°C, Avanti 30, Beckman) y se liofilizaron (48 horas a -34°C, Labconco Corp).

El tamaño y la polidispersión de las nanopartículas se midieron con espectroscopia de correlación fotónica (PCS) y la carga superficial se determinó mediante anemometría láser - Doppler (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments) (Tabla 1).

La composición de las matrices se analizó empleando espectroscopia de RMN de ¹H ((Bruker AMX-300) a partir de muestras liofilizadas y disueltas en cloroformo deuterado. Estos estudios confirmaron la presencia del poloxamer/poloxamina en la matriz de las nanopartículas. De las intensidades de los picos correspondientes también se puede concluir que la cantidad del copolímero bloque polioxietileno-polioxipropileno se puede cambiar ajustando los parámetros de la preparación. (Figura 1.)

El análisis morfológico de las nanoestructuras se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (CM 12 Philips) utilizando muestras teñidas con una solución de 2% ácido fosfotúngstico. (Figura 2).

TABLA 1

PLGA:poloxamer	Pluronic.TM F68		
	tamaño (nm)	P.I.	pot. ζ (mV)
1 : 0	191.5±7.1	0.046	-60.1±7.4
1 : 0,5	162.8±4.4	0.079	-50.2±0.8
1 : 1	163.2±5.1	0.135	-43.1±6.4
1 : 1,5	159.8±6.5	0.163	-38.5±0.6

Ejemplo 2

Se prepararon nanopartículas de mezcla íntima con la técnica modificada de difusión del solvente anteriormente descrita, pero cambiando el tipo del copolímero polioxietileno-polioxipropileno. El PLGA y las distintas cantidades del poloxamer Pluronic.TM L121 (HLB=1) se disolvieron en diclorometano y esta solución orgánica se mezcló mediante vortex con un pequeño volumen de fase acuosa. La emulsión así obtenida se añadió bajo agitación a etanol. Las formulaciones se diluyeron con agua y la agitación se mantuvo durante 10 minutos más. Después de la evaporación del solvente las nanopartículas se concentraron en medio acuoso. Opcionalmente, para su posterior análisis las nanopartículas se centrifugaron y se liofilizaron. El tamaño y la polidispersión de las nanopartículas se midieron mediante PCS y la carga superficial se determinó con anemometría laser-Doppler (Tabla 2). La morfología y la composición de las matrices se estudiaron empleando espectroscopia RMN de ¹H y microscopía TEM.

TABLA 2

PLGA:poloxamer	Pluronic.TM L121		
	tamaño (nm)	P.I.	pot. ζ (mV)
1 : 0	191.5±7.1	0.046	-60.1±7.4
1 : 0,5	164.5±6.3	0.156	-27.3±7.1
1 : 1	185.5±6.0	0.195	-30.0±8.0
1 : 1,5	257.3±10.0	0.179	-24.5±5.5

Ejemplo 3

Se prepararon nanopartículas de mezcla íntima con la técnica modificada de difusión del solvente anteriormente descrita, pero cambiando el tipo del copolímero polioxietileno-polioxipropileno: el PLGA y las distintas cantidades de la poloxamina Tetronic.TM 908 (HLB=30,5) se disolvieron en diclorometano y esta solución orgánica se mezcló mediante vortex con un pequeño volumen de fase acuosa. La emulsión así obtenida se añadió bajo agitación a etanol.

ES 2 232 287 B1

Las formulaciones se diluyeron con agua y la agitación se mantuvo durante 10 minutos más. Después de la evaporación del solvente las nanopartículas se concentraron en medio acuoso.

Opcionalmente, para su posterior análisis las nanopartículas se centrifugaron y se liofilizaron. El tamaño y la polidispersión de las nanopartículas se midieron mediante PCS y la carga superficial se determinó con anemometría laser-Doppler (Tabla 3). La morfología y la composición de las matrices se estudiaron empleando espectroscopia RMN de ¹H y microscopía TEM (Figura 3 y 4).

TABLA 3

PLGA:poloxamina	Tetronic.TM 908		
	tamaño (nm)	PI.	pot.ζ (mV)
1 : 0	191.5 ± 7.1	0.046	-60.1 ± 7.4
1 : 0,5	189.2 ± 4.6	0.202	-30.9 ± 3.9
1 : 1	174.0 ± 5.4	0.271	-26.9 ± 1.2
1 : 1,5	171.2 ± 3.2	0.235	-24.1 ± 1.0

Ejemplo 4

Se prepararon nanopartículas de mezcla íntima con la técnica modificada de difusión del solvente anteriormente descrita, pero cambiando el tipo del copolímero polioxietileno-polioxipropileno: el PLGA y las distintas cantidades de la poloxamina Tetronic.TM 904 (HLB=14,5) se disolvieron en diclorometano y esta solución orgánica se mezcló mediante vortex con un pequeño volumen de fase acuosa. La emulsión así obtenida se añadió bajo agitación a etanol. Las formulaciones se diluyeron con agua y la agitación se mantuvo durante 10 minutos más. Después de la evaporación del solvente las nanopartículas se concentraron en medio acuoso.

Opcionalmente, para su posterior análisis las nanopartículas se centrifugaron y se liofilizaron. El tamaño y la polidispersión de las nanopartículas se midieron mediante PCS y la carga superficial se determinó con anemometría laser-Doppler (Tabla 4). La morfología y la composición de las matrices se estudiaron empleando espectroscopia RMN de ¹H y microscopía TEM (Figura 3 y 4).

TABLA 4

PLGA:poloxamina	Tetronic.TM 904		
	tamaño (nm)	PI.	pot.ζ (mV)
1 : 0	191.5 ± 7.1	0.046	-60.1 ± 7.4
1 : 0,5	160.2 ± 5.6	0.188	-40.0 ± 4.6
1 : 1	168.7 ± 9.4	0.179	-38.4 ± 3.3
1 : 1,5	168.8 ± 2.5	0.160	-39.6 ± 2.0

Ejemplo 5

Se prepararon nanopartículas de mezcla íntima con la técnica modificada de difusión del solvente anteriormente descrita, pero cambiando el tipo del copolímero polioxietileno-polioxipropileno: el PLGA y las distintas cantidades de la poloxamina Tetronic.TM 901 (HLB=14,5) se disolvieron en diclorometano y esta solución orgánica se mezcló mediante vortex con un pequeño volumen de fase acuosa. La emulsión así obtenida se añadió bajo agitación a etanol. Las formulaciones se diluyeron con agua y la agitación se mantuvo durante 10 minutos más. Después de la evaporación del solvente las nanopartículas se concentraron en medio acuoso.

Opcionalmente, para su posterior análisis las nanopartículas se centrifugaron y se liofilizaron. El tamaño y la polidispersión de las nanopartículas se midieron mediante PCS y la carga superficial se determinó con anemometría laser-Doppler (Tabla 5). La morfología y la composición de las matrices se estudiaron empleando espectroscopia RMN de ¹H y microscopía TEM.

ES 2 232 287 B1

TABLA 5

5	PLGA:poloxamina	Tetronic.TM 901		
		tamaño (nm)	P.I.	pot.ζ (mV)
	1 : 0	191.5 ± 7.1	0.046	-60.1 ± 7.4
	1 : 0,5	205.3 ± 54.5	0.162	-25.4 ± 5.0
10	1 : 1	277.4 ± 102.9	0.308	-28.9 ± 5.4
	1 : 1,5	333.7 ± 82.1	0.275	-38.2 ± 8.3

15 Ejemplo 6

Las nanopartículas de mezcla íntima de PLGA/Pluronic.TM F68, PLGA/Pluronic.TM L121, PLGA/Tetronic.TM 908 y PLGA/Tetronic 904 con relación de polímero 1:1 se prepararon como ha sido descrito en los Ejemplos 1, 2, 3 y 4. Se incorporaron dos agentes crioprotectores (glucosa y trehalosa) en el medio de suspensión de las nanopartículas. Las formulaciones, a diferentes concentraciones (1, 2.5, 5 mg/ml), se liofilizaron en la presencia de 5% o 10% del crioprotector. El tamaño y la polidispersión de las nanopartículas se midieron después del proceso de liofilización-resuspensión y se compararon con los valores iniciales. Los efectos de la concentración de las nanopartículas, el tipo y la concentración del crioprotector han sido evaluados. Se puede concluir que en presencia de 5% de crioprotector, todas las formulaciones se pueden liofilizar a concentraciones relativamente elevadas (2,5 mg/ml) sin agregación significativa (Figura 7 y 8).

TABLA 6

30	cryoprotector	dilución de NPs mg/ml	relación de tamaños resuspendido/original			
			F68	L121	T908	T904
35	5% glucosa	1	1,21±0,04	1,25±0,21	1,17±0,04	1,18±0,01
		2,5	1,15±0,06	1,65±0,29	1,12±0,09	1,59±0,35
		5	1,11±0,09	2,62±0,73	1,03±0,05	3,77±0,39
40	10% glucosa	1	1,28±0,04	1,32±0,39	2,60	1,04
		2,5	1,39±0,15	1,69±0,67	1,59	1,18
		5	1,30±0,10	2,25±0,15	1,20	1,33
45	5% trehalosa	1	1,22±0,17	3,58±2,47	1,13±0,04	1,29±0,17
		2,5	1,93±0,55	4,66±2,9	1,21±0,03	2,27±0,90
		5	1,57±0,27	5,23±0,21	1,23±0,04	5,66±4,48
50	10% trehalosa	1	1,21±0,12	2,32±1,09	1,25±0,10	1,64
		2,5	1,30±0,07	5,46±0,99	1,46±0,06	2,33
		5	1,82±0,51	5,35±0,52	1,46±0,20	2,74

50 Ejemplo 7

Las nanopartículas de mezcla íntima de PLGA/Pluronic.TM F68, PLGA/Pluronic.TM L121, PLGA/Tetronic.TM 908 y PLGA/Tetronic 904 con relación de polímero 1:1 se prepararon como ha sido descrito en los Ejemplos 1, 2, 3 y 4. El plásmido modelo pEGFP-C 1 (codificante de una proteína fluorescente verde) se incorporó en la fase acuosa interna de las formulaciones con una carga teórica de 0,4%. El tamaño, la polidispersión y la carga superficial de las formulaciones cargadas con ADN se midieron empleando espectroscopia de correlación fotónica y anemometría laser-Doppler (Tabla 7). La eficacia de encapsulación y los perfiles de liberación “*in vitro*” se determinaron a partir de las muestras de sobrenadantes de diferentes tiempos con ensayos fluorimétricos utilizando PicoGreen Quantitation Kit (Molecular Probes) en tampón T.E. a pH = 7,5 (Figura 9).

65

ES 2 232 287 B1

TABLA 7

	tipo de poloxamer/poloxamina	tamaño (nm)	P.I.	potencial-Z (mV)	eficacia de encapsulación %
5	Pluronic.TM F68	182,6 ± 6,0	0,114	-50,8 ± 3,6	35,2 ± 8,9
	Pluronic.TM L121	216,8 ± 5,3	0,154	-23,5 ± 1,4	31,3 ± 3,8
10	Tetronic.TM T908	268,7±11,6	0,437	-35,0 ± 0,9	32,0 ± 3,7
	Tetronic.TM T904	161,5 ± 7,6	0,154	-54,1 ± 2,0	44,1 ± 4,3

Ejemplo 8

15 Las nanopartículas de mezcla íntima de PLGA/Pluronic.TM F68, PLGA/Pluronic.TM L121, PLGA/Tetronic.TM 908 y PLGA/Tetronic 904 con relación de polímero 1:1 se prepararon como ha sido descrito en los Ejemplos 1, 2, 3 y 4. La citotoxicidad de las formulaciones se estudió en el cultivo celular MCF-7 en DMEM suplementado con 10% FBS. Las células de incubaron con distintas concentraciones de nanopartículas (de 1 a 5 mg/ml) durante 24
20 horas. La viabilidad celular se midió con el reactivo MTS después de un periodo de recuperación de 24 horas. Los resultados demuestran que, a pesar de las concentraciones altas y el tiempo de incubación extendido, ninguna de las formulaciones produce efectos tóxicos en las células.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de preparación de nanopartículas de tamaño inferior a $1\ \mu\text{m}$ para la administración de ingredientes activos, **caracterizado** porque comprende las etapas de:

- 10 a) disolver un polímero biodegradable junto con un copolímero bloque derivado del polioxietileno en un disolvente orgánico, estando la relación en peso de ambos polímeros entre 1:0,1 y 1:3.
- 15 b) añadir, bajo agitación, la disolución obtenida a una fase polar, en la cual el polímero biodegradable presenta una baja solubilidad, precipitando el polímero y formándose las nanopartículas.
- c) eliminar el disolvente orgánico;
- d) aislar las partículas,

donde el ingrediente activo es disuelto en el disolvente orgánico empleado en a), antes o después de la etapa a), o es disuelto en un volumen pequeño de fase acuosa, el cual subsiguientemente es dispersado en el solvente orgánico empleado en a), antes o después de la etapa a).

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una etapa adicional después de e) de liofilizar las nanopartículas obtenidas.

25 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el polímero biodegradable es un poliéster.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el polímero biodegradable es un polianhidrido.

30 5. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el poliéster se selecciona entre la policaprolactona, el ácido poliláctico, el ácido poliláctico-coglicólico y sus mezclas.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el copolímero bloque es poloxamero.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el poloxamero tiene un peso molecular comprendido entre 1.000-25.000 Daltons.

40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el copolímero bloque es poloxamina.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la poloxamina tiene un peso molecular comprendido entre 1.000-25.000 Daltons.

45 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el ingrediente activo se selecciona de moléculas con propiedades terapéuticas, vacunas e ingredientes cosméticos.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la relación en peso de ambos polímeros está entre 1:1 y 1:3.

50 12. Nanopartículas para la administración de ingredientes farmacéuticamente o cosméticamente activos, de tamaño inferior a $1\ \mu\text{m}$, obtenibles mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10.

55 13. Nanopartículas liofilizadas para la administración de ingredientes farmacéuticamente o cosméticamente activos, de tamaño inferior a $1\ \mu\text{m}$, obtenibles mediante el procedimiento según la reivindicación 2.

14. Composiciones **caracterizadas** porque comprenden nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13.

60 15. Composiciones farmacéuticas o cosméticas **caracterizadas** porque comprenden nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13.

65

FIGURA 1

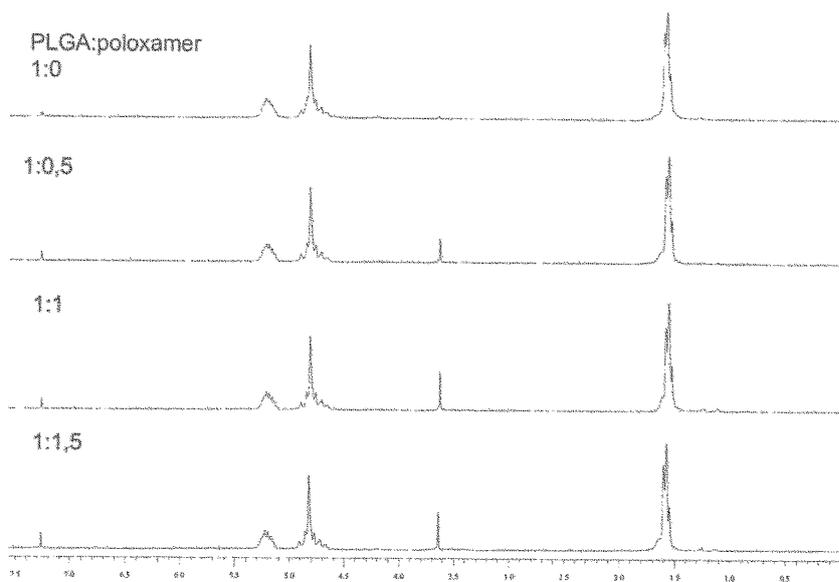


FIGURA 2

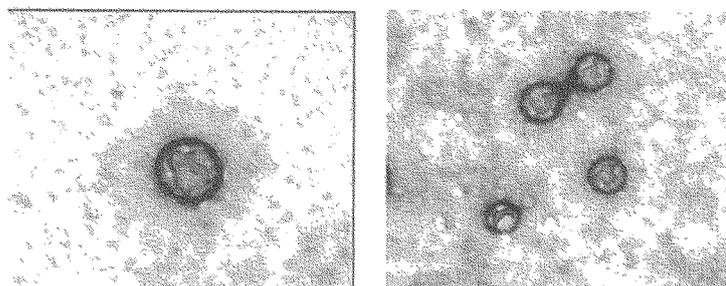


FIGURA 3.

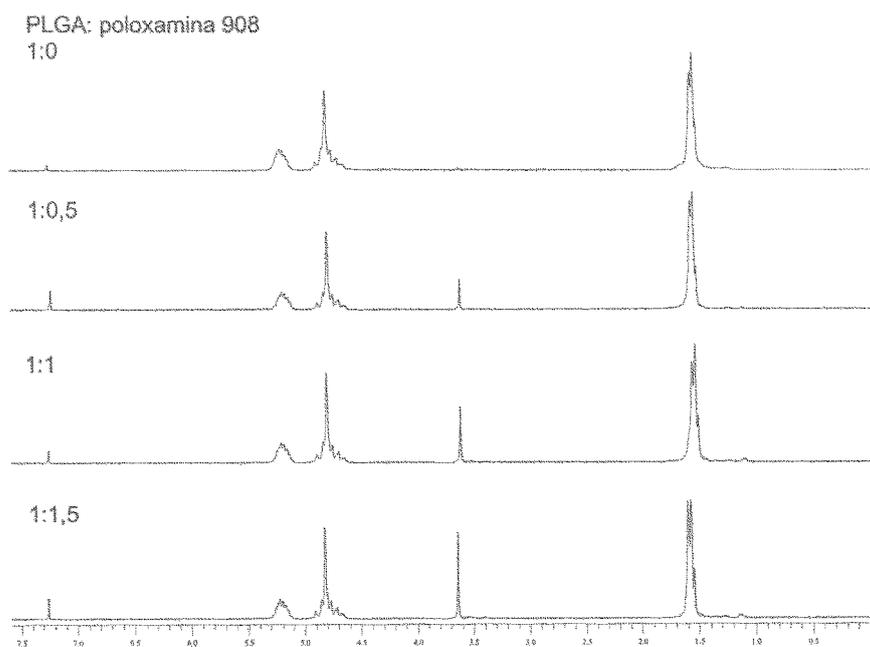


FIGURA 4

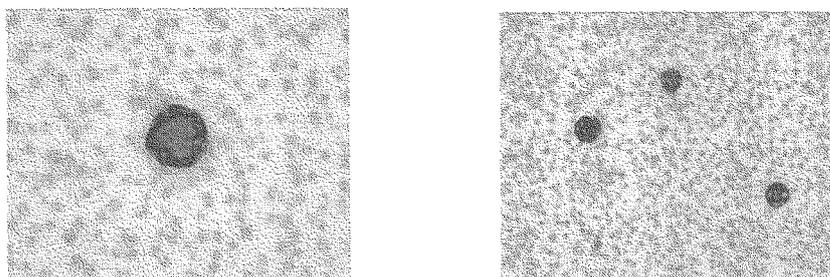


FIGURA 5.

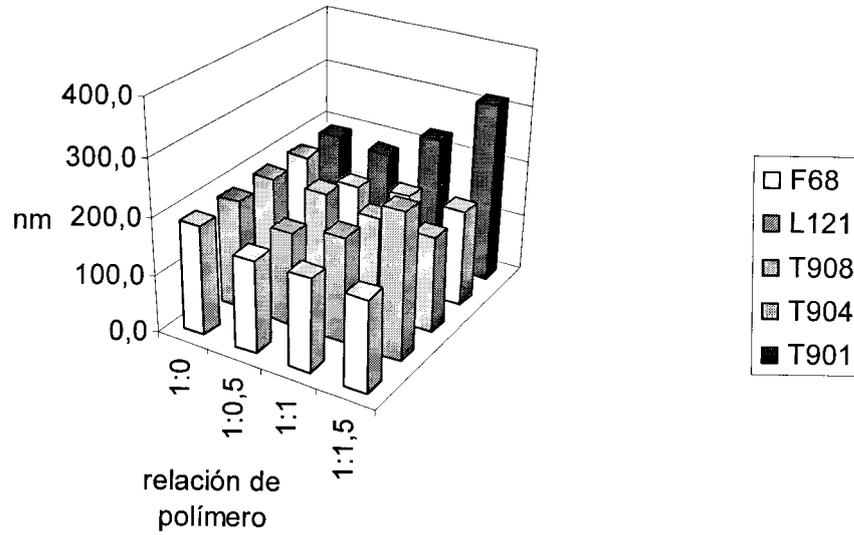


FIGURA 6.

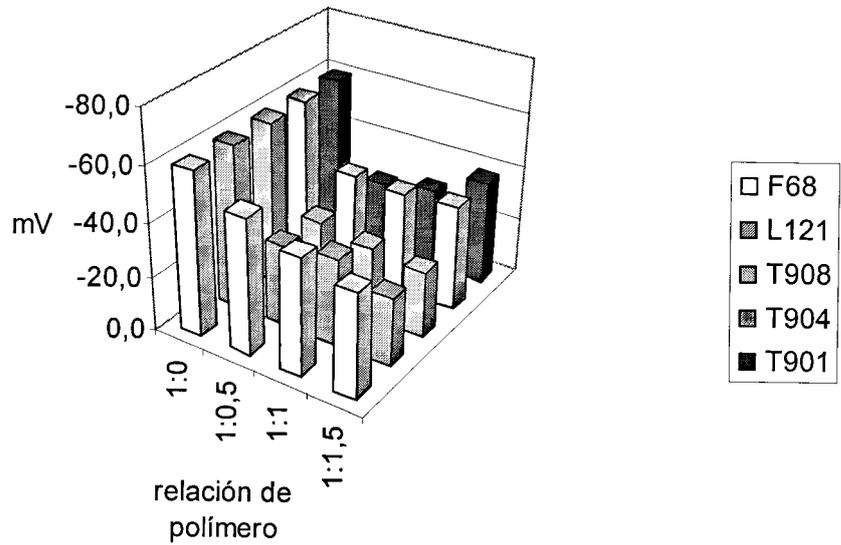


FIGURA 7.

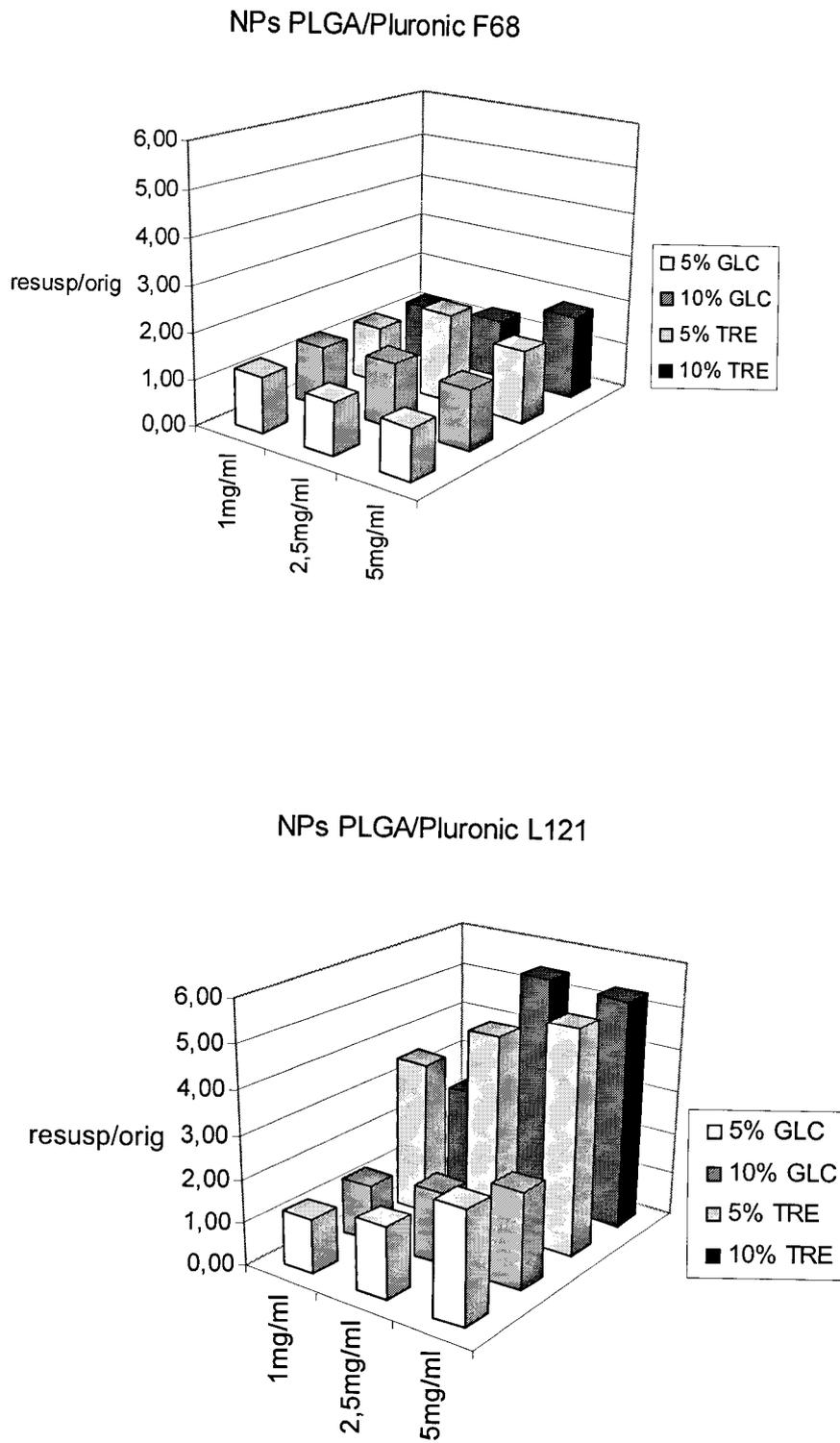
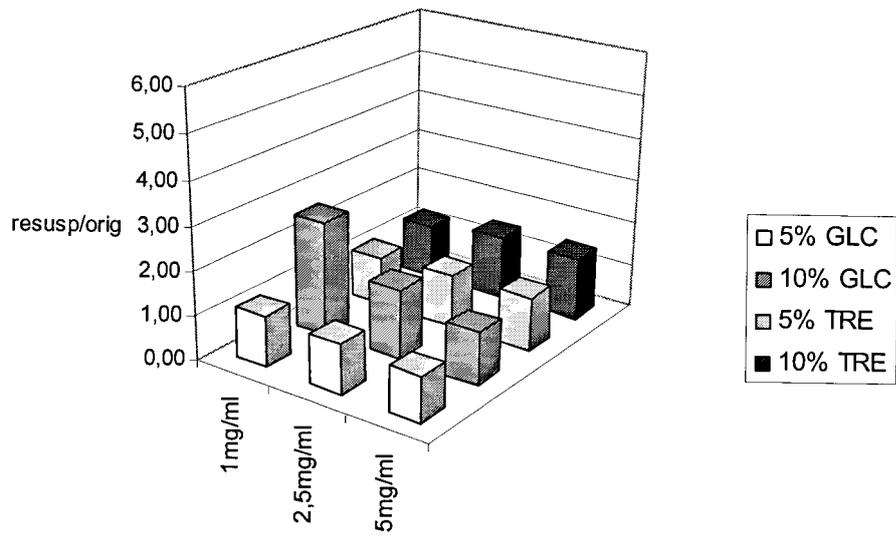


FIGURA 8.

NPs PLGA/Tetronic 908



NPs PLGA/Tetronic 904

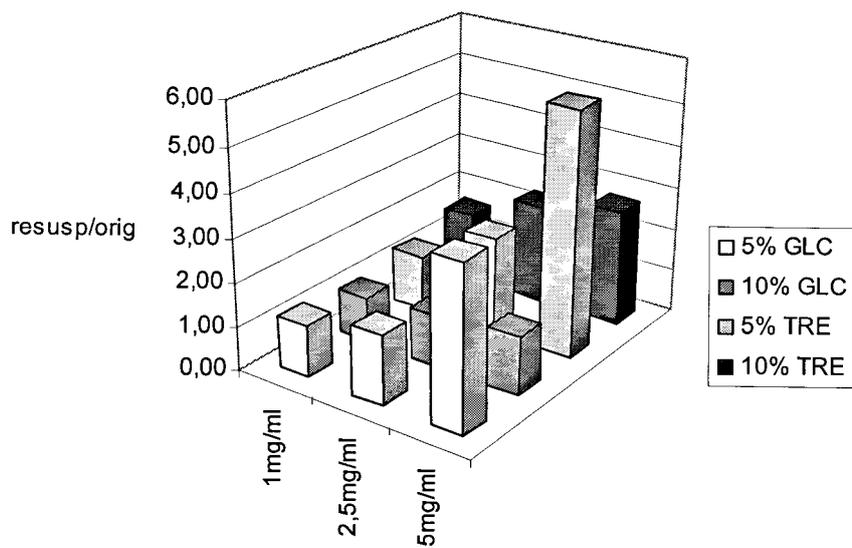


FIGURA 9.

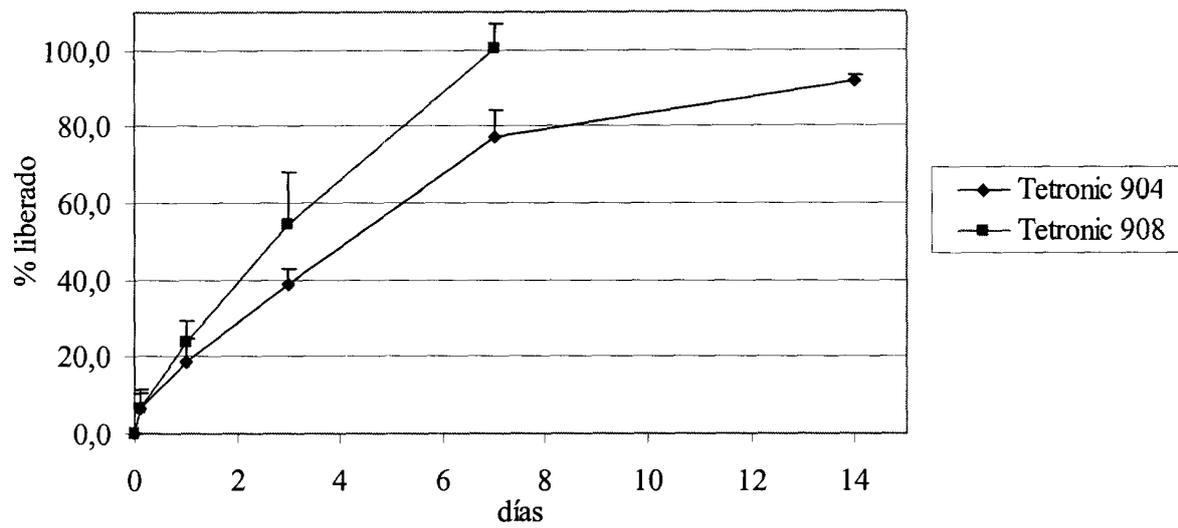
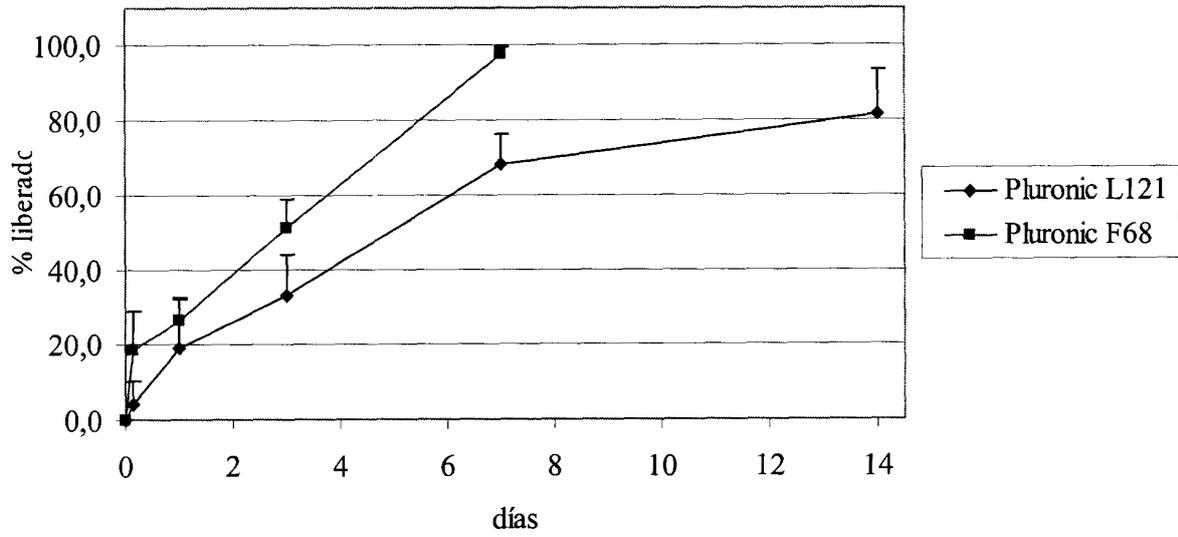
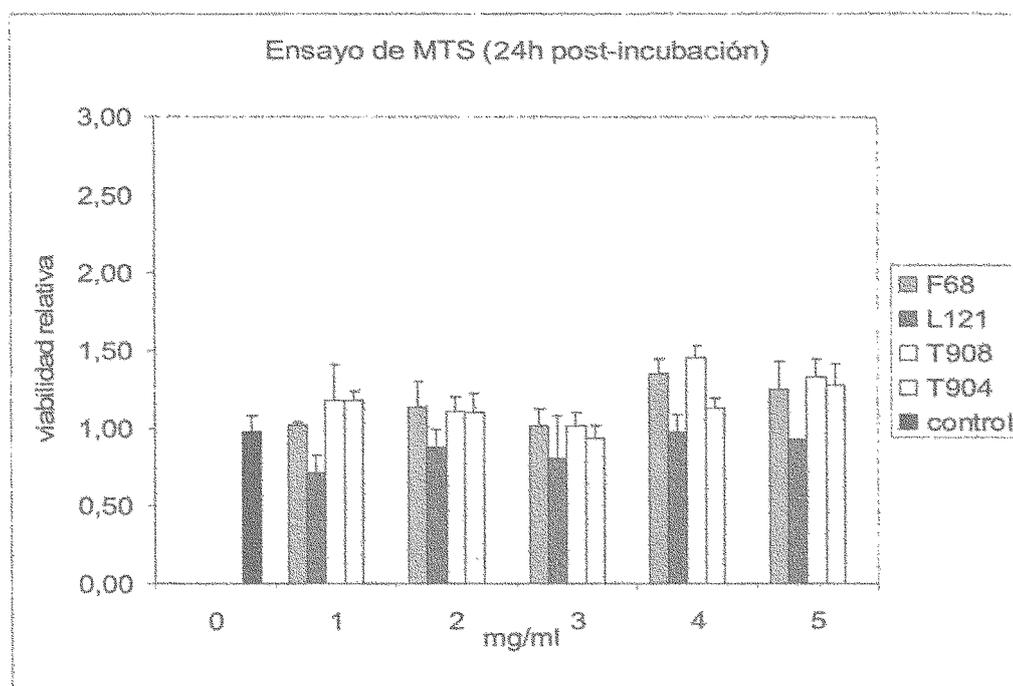


FIGURA 10.





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 232 287

② Nº de solicitud: 200301570

③ Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 9/51

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LOURENCO, C. et al. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. Int. J. Pharmaceutics, 138, (1996), 1-12.	1-15
A	WO 9620698 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 11.07.1996, página 6, línea 13 - página 8, línea 15; página 13, líneas 1-17; página 22, línea 18 - página 23, línea 5; página 74, línea 13 - página 75, línea 6; tabla 4.	1-15
A	SÁNCHEZ, A. et al. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. Eur. J. Pharma. Sciences, 18, (3-4), marzo 2003, 221-229.	1-15
A	US 5962566 A (GRANDFILS et al.) 05.10.1999, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.04.2005

Examinador

N. Vera Gutiérrez

Página

1/1