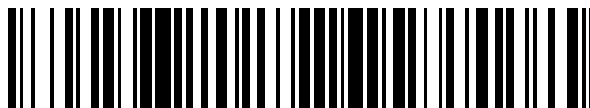


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 480**

21 Número de solicitud: 201301190

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

B82Y 5/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

19.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.07.2015

Fecha de la concesión:

30.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.06.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070941

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (75.0%)
Hospital Real. Avda. Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES;
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (15.0%) y
UNIVERSIDAD DE JAÉN (10.0%)

72 Inventor/es:

PRADOS SALAZAR, José Carlos;
ARÁNEGA JIMÉNEZ, Antonia;
MELGUIZO ALONSO, Consolación;
RODRÍGUEZ SERRANO, Fernando;
VÉLEZ FERNÁNDEZ, María Celia;
ARIAS MEDIANO, José Luis;
GONZÁLEZ FLORES, Encarnación;
LUQUE CARO, Raquel;
ORTIZ QUESADA, Raúl y
RAMA BALLESTEROS, Ana Rosa

54 Título: **Nanopartículas poliméricas que comprenden poli(butilcianoacrilato) o poli(ε-caprolactona) para su uso en terapia**

57 Resumen:

Nanopartículas poliméricas que comprenden poli(butilcianoacrilato) o poli(ε-caprolactona) para su uso en terapia.

La presente invención se refiere a nanopartículas de liberación prolongada de principios activos, el uso de dichas nanopartículas en terapia, preferiblemente para el tratamiento antitumoral, y al método de síntesis de dichas nanopartículas.

ES 2 541 480 B1

DESCRIPCIÓN

NANOPARTÍCULAS POLIMERICAS QUE COMPRENDEN POLI(BUTILCIANOACRILATO) O POLI(ε-CAPROLACTONA) PARA SU USO EN TERAPIA

5

Campo de la invención

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, de la Química, la Bioquímica y la Inmunología, y se refiere a un sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas capaz de dirigirse hacia
10 receptores o dianas de forma selectiva, y en particular a la funcionalización de nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) (PBCA) o poli(ε-caprolactona) (PCL) que transportan un fármaco, preferiblemente 5-fluoruracilo. La presente invención se refiere también a las composiciones, al procedimiento de preparación y a los usos del sistema para el transporte de moléculas
15 biológicamente activas.

Antecedentes de la invención

La necesidad de encontrar tratamientos eficaces contra el cáncer, ha hecho que se incrementen las líneas de investigación en esta materia. Esto ha llevado
20 a la identificación de nuevas estrategias terapéuticas y al desarrollo de un amplio número de nuevos agentes terapéuticos. Las moléculas generadas suelen presentar algunas limitaciones como: i) no llegar en cantidad suficiente al lugar donde se localiza el tumor; ii) no son suficientemente eficaces en el micro-entorno tumoral; iii) ser ineficaz en el tumor por el desarrollo de
25 mecanismos de resistencia; y iv) no ser lo suficientemente específicos frente a un tipo tumoral. Estos son los motivos del fracaso de tratamientos a determinados tipos de cáncer teóricamente sensibles a los agentes quimioterapéuticos. Un ejemplo claro lo constituye el uso del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado, el
30 cual sólo induce una respuesta global entorno al 10%. Además se ha descrito

que la combinación de este agente con otros antitumorales sólo ha logrado mejorar la eficacia entorno al 45% de los casos (Zhang, N. *et al.*, 2008. *Molecules* 13, 1551-1569).

Entre las principales causas que justifican el fracaso del tratamiento antitumoral destacan: i) la farmacocinética desfavorable de los agentes antitumorales (caracterizada por un rápido aclaramiento y una rápida biodegradación, que dan lugar a una corta vía plasmática) determina el uso de dosis altamente tóxicas y a una rigurosa pauta de tratamiento para conseguir el efecto terapéutico deseado; ii) la extensa biodistribución y extravasación de la molécula antitumoral en zonas no deseadas determina su elevada toxicidad; iii) la selectividad de estos fármacos por el tejido tumoral generalmente es pobre; iv) la susceptibilidad de desarrollar resistencia a los anticancerosos por parte de las células tumorales; y v) las propiedades fisicoquímicas desfavorables de los agentes antitumorales, por ejemplo, su hidrofobia, inducen una escasa acumulación en el lugar de acción (Arias, J.L. 2008. *Molecules* 13, 2340-2369; Durán, J.D.G. *et al.*, 2008. *J. Pharm. Sci.* 97, 2948-2983).

Con el objetivo de solucionar estos problemas se han asociado antitumorales con sistemas coloidales en el tratamiento del cáncer (Arias, J.L. 2008. *Molecules* 13, 2340-2369), Esta asociación pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral, e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosas a estos agentes activos. Otros beneficios de la localización exclusiva de los agentes quimioterápicos en la región diana son la mejora de su perfil farmacocinético y la disminución de la toxicidad asociada a la extensa biodistribución de estas moléculas. Además, los sistemas coloidales pueden lograr una protección adecuada de estos principios activos *in vitro* (durante el almacenamiento) e *in vivo* (frente a fenómenos de biodegradación relacionados principalmente con sistemas enzimáticos), lo que reducirá la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos (Arias, J.L. 2008. *Molecules* 13, 2340-2369; Durán, J.D.G. *et al.*, 2008. *J. Pharm. Sci.* 97, 2948-2983; Davis *et al.*, 2008. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7(9), 771-782), Es por ello que numerosos esfuerzos se están concentrando en la formulación de coloides, basados principalmente en sistemas vesiculares (liposomas y niosomas) o poliméricos, para conseguir el transporte eficaz de

- cualquier antitumoral a la zona diana (Arias, J.L. 2008. *Molecules* 13, 2340-2369; Choet *et al.*, 2008. *Clin. Cancer Res.* 14, 1310-1316.). Sin embargo, recientes investigaciones han probado que esta simple asociación no siempre resulta suficiente para lograr dirigir específicamente un fármaco a cualquier
- 5 zona del organismo, más allá de los órganos pertenecientes al sistema retículo endotelial (Reddy *et al.*, 2005. *J. Phys. Chem.* 109, 3355-3363; Couvreur y Vauthier, 2006. *Pharm. Res.* 23(7), 1417-1450), Es por todo esto que actualmente se están desarrollando importantes investigaciones (con resultados muy prometedores) encaminadas al diseño de sistemas
- 10 transportadores pasivos de fármacos (basados en el efecto de permeación y retención incrementada) y sistemas transportadores activos de fármacos al lugar de acción (fundamentados en las interacciones ligando-receptor, y en el diseño de nanopartículas sensibles a estímulos externos) (Reddy *et al.*, 2005. *J. Phys. Chem.* 109, 3355-3363; Arias, J.L. 2008. *Molecules* 13, 2340-2369).
- 15 Se han descrito nanopartículas magnéticas de poli(ϵ -caprolactona) que contienen un fármaco para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el gran tamaño que presentan dichas partículas hace que su acumulación en la región diana sea pobre, de tal forma que la eficacia del tratamiento se ve mermada (Gang, J. *et al.*, 2007. *J. Drug Target.* 15(6), 445-53; Arias, J.L. *et al.*, 2010.
- 20 *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75, 204-208).

Existen numerosos documentos que describen la elaboración de nanopartículas de poli(butilcianoacrilato). Las partículas de poli(butilcianoacrilato) (PBCA) cumplen requisitos ideales tales como la biodegradabilidad, la capacidad de alterar la biodistribución de fármacos y la

25 facilidad de síntesis y purificación (Beck, P.H. *et al.*, 1994. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40, 134-37; Kreuter, J. *et al.*, 1995 *Brain Res.* 674, 171-74; Schroeder, U. *et al.*, 1996. *Brain Res.* 1996. 710, 121-24; Couvreur, P. *et al.*, 1979. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 331-32). El pH óptimo de polimerización para la formación de dichas nanopartículas se encuentra por debajo de 5,0, así

30 como la temperatura de polimerización elevada (60 °C) (Behan, N. *et al.*, 2001. *Biomaterials* 22, 1335-44).

Dentro de los diferentes polímeros biodegradables y biocompatibles que se emplean como transportadores, el butilcianocrilato es ampliamente utilizado.

Existe pues la necesidad de proporcionar unas nanopartículas que sean de un tamaño mínimo que permita una mayor acumulación de las mismas en la
5 región diana, que minimicen los fenómenos de reconocimiento y retirada de las mismas por el sistema inmune y mejore por tanto la eficacia del tratamiento.

De entre las posibilidades propuestas recientemente para superar las dificultades de la administración de fármacos, destaca la incorporación de los ingredientes activos en partículas de pequeño tamaño. La interacción de dichas
10 partículas con las mucosas se ve afectada entre otros factores por el tamaño de estas partículas, aumentando dicha interacción con la disminución del tamaño de las partículas. En función de su tamaño los podemos clasificar en micro- y nano-sistemas.

Entre los diferentes tipos de nanosistemas, las nanopartículas son de especial
15 relevancia en el transporte de moléculas biológicamente activas debido a sus ventajas, como son:

- la protección del fármaco encapsulado frente a la degradación enzimática y la capacidad para controlar la liberación hasta alcanzar su sitio de acción;
- la gran capacidad de penetración en microcapilares o en compartimentos
20 intracelulares o para atravesar la barrera hematoencefálica debido a su tamaño nanométrico;
- el uso de polímeros biodegradables para su preparación, que permite la liberación controlada del fármaco durante días, semanas o meses.

En el caso de las nanopartículas poliméricas, se suman propiedades
25 importantes como la biocompatibilidad y biodegradabilidad que permiten su uso en una gran variedad de aplicaciones en el campo de la medicina. Así pues, en el tratamiento del cáncer por ejemplo, se emplean transportadores de fármacos poliméricos que permiten el transporte del fármaco selectivamente minimizando su biodistribución, metabolización biológica y la eliminación del medicamento
30 que transporta, permitiendo un mayor efecto terapéutico con una baja toxicidad.

Se han desarrollado sistemas nanoparticulados a base de polímeros hidrófilos para su aplicación como sistemas de liberación de fármacos. Así lo demuestra la abundante literatura existente en este campo. Se han publicado numerosos trabajos que describen diversos métodos de elaboración de nanopartículas

5 hidrófilas a base de macromoléculas de origen natural como son las nanopartículas de albúmina (Lin, W. *et al.*, 1994. *Pharm. Res.*, 11) y gelatina (Watzke, H.J. *et al.*, 1994. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 50, 1-14,) y a base de polisacáridos como el alginato (Rajaonarivony M. *et al.*, 1993. *J. Pharm. Sci.*, 82, 912-7). Sin embargo la mayoría de estos métodos requieren el uso de

10 disolventes orgánicos, aceites y elevadas temperaturas, aspectos que limitan enormemente la explotación de estos sistemas.

En la literatura se han descrito multitud de métodos para la síntesis de nanopartículas, entre los más importantes destacan: el método de polimerización en emulsión continua en la fase acuosa, el método de

15 polimerización en emulsión continua en la fase orgánica, la polimerización interfacial, la disposición interfacial del polímero con evaporización de disolventes, la desolvatación de moléculas y los métodos de diálisis (Marty *et al.* 1978 *Pharm. Acta Helv.* 53, 17). La polimerización en monómeros en presencia de surfactantes por encima de la concentración micelar crítica

20 (polimerización por emulsión) conduce generalmente a la formación de partículas de menor tamaño (Bhawal, S. *et al.*, 2002. *Eur. Polym. J.* 38, 735-44).

Breve descripción de la invención

25

Un primer aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula polimérica, de ahora en adelante nanopartícula de la invención, obtenible por un procedimiento que comprende:

i) la disolución de al menos uno o más polímeros biodegradables, en un

30 disolvente orgánico,

ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo, para obtener una partícula

iii) el aislamiento de la partícula obtenida, donde se incorpora el principio activo mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el procedimiento además comprende una etapa de evaporación del disolvente orgánico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, además comprende una redispersión de la nanopartícula polimérica hasta que la conductividad del sobrenadante sea menor o igual a 10 $\mu\text{S/cm}$.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante una centrifugación.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la etapa (ii) se realiza de manera secuencial.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el antisolvente es agua o agua mezclada con un disolvente orgánico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula tiene un tamaño de partícula medio de entre 55 y 85 nm. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, al menos un polímero biodegradable es el poli(butilcianocrilato) o la poli(ϵ -caprolactona).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polímero biodegradable de poli(butilcianocrilato) tiene un peso molecular inferior a 10.000 Daltons, preferiblemente entre 3.000 y 100 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 2.000 y 500 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 1.500 Daltons, o donde el polímero biodegradable de poli(ϵ -caprolactona) tiene un peso molecular inferior a 100.000 Daltons, preferiblemente entre 5.000 y 45.000 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 7 y 20.000 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 10.000 Daltons.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula comprende como polímero biodegradable un 90% de poli(butilcianocrilato) o un 75% de poli(ϵ -caprolactona).

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula comprende al menos un análogo de pirimidina como principio activo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el poli(butilcianocrilato) y el análogo de pirimidina, o la poli(ϵ -caprolactona) y el análogo de pirimidina están en un ratio suficiente para mantenerse asociados.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el ratio suficiente para mantenerse asociados el poli(butilcianocrilato) y el análogo de pirimidina es un ratio de entre 1000:1 y 1:100 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 5:1 y 15:1 p/p; o el ratio suficiente para mantenerse asociados la poli(ϵ -caprolactona) y el análogo de pirimidina es un ratio de entre 1000:1 y 1:100 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 2:1 y 10:1 p/p.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula comprende un % de tensoactivo en un porcentaje de entre 0.2% y 5%.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el tensoactivo se selecciona de lista que comprende: polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, polivinil alcohol de alto o bajo peso molecular, polivinilpirrolidona, fosfatidil
20 colina, lecitinas, copolímeros en bloques anfifílicos, poloxameros de distintos tipos, solutol HS15, glicocolato sódico, taurocolato sódico, tauroglicocolato sódico, taurodeoxicolato sódico, hemisuccinato de colesterilo y tiloxapol.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el tensoactivo es un copolímero en bloques anfifílicos, más preferiblemente es un poloxámero, y
25 aún más preferiblemente es plurónico F68.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el análogo de pirimidina se selecciona de la lista que consiste en citarabina, fluorouracilo (5-fluorouracilo o 5-FU), tegafur o fltorafur, carmofur, gemcitabina, capecitabina, azacitidina, decitabina, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos,
30 derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones. Aún más

preferiblemente, es el 5-fluorouracilo (5-FU), o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos. Aún mucho más preferiblemente, la nanopartícula de la invención comprende 5-fluorouracilo (5-FU) en un porcentaje de entre 0.1% y 25%.

- 5 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende la nanopartícula de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica. En otra realización más preferida de este aspecto
- 10 de la invención además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Aún más preferiblemente, además comprende otro principio activo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica está formulada para su uso por vía parenteral, preferiblemente para su uso intravenoso, intraarterial, intratumoral, intramuscular o subcutáneo.

- 15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica está en forma sólida para administración oral, preferiblemente en comprimidos o cápsulas.

- Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula de la invención o de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la nanopartícula de la invención o la
- 20 composición de la invención para su uso como medicamento.

- Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula de la invención o de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, o alternativamente, a la
- 25 nanopartícula de la invención o la composición de la invención para para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es el cáncer colorrectal.

- Un quinto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de una nanopartícula con un tamaño medio inferior a 100 nm, preferiblemente
- 30 inferior a 75 nm, que comprende uno o más polímeros degradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un polímero

biodegradable es el poli(butilcianoacrilato) o el poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos un principio activo es el 5-fluorouracilo y que consiste en:

- i) la disolución de uno o más polímeros biodegradables, en un disolvente orgánico.
- 5 ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo
- iii) el aislamiento de la partícula obtenida, donde se incorpora el principio activo mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la
- 10 etapa (i).

Descripción de las figuras

Fig. 1. Estructura molecular de la poli(ϵ -caprolactona) (a) y poli(butilcianoacrilato) (b).

15 **Fig. 2.** Visualización mediante microscopio electrónico de las nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) (a) y poli(ϵ -caprolactona) (b). Longitud de barra: 1 μ m (a), and 200 nm (b).

20 **Fig. 3.** Citotoxicidad In vitro de poli(butilcianoacrilato) (a) y poli(ϵ -caprolactona) (b) en un rango de concentraciones (0.1-20 μ M) en las líneas MC38, CCD-18, HCT-15, HT-29 y T84 derivadas de cáncer de colon después de tres días de incubación con los agentes descritos. Los datos representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos. PBCA y PCL no mostraron toxicidad en las líneas testadas a las concentraciones necesarias para su de utilización con el fármaco antitumoral y después de 72 horas de tratamiento. Por lo tanto, estas nanopartículas tienen una multabiocompatibilidad

25 **Fig. 4.** Citotoxicidad in vitro de la NP 5-FU-poli(butilcianoacrilato) en comparación con el agente 5-FU libre en las líneas de cáncer de colon en T84(a), HT-29 (b), HCT-15 (c), CCD-18 (d), yMC38(e). El grado de inhibición del crecimiento se midió en 72 horas usando el ensayo de SRB. El porcentaje de supervivencia se determinó mediante la normalización de la absorbancia de

los controles a 100%. Además, los NP y libre de 5-FU se utilizan conjuntamente para demostrar la no-interacción. Los datos se representan como valor medio $\pm$ SD de los cultivos por cuadruplicado.

5 **Fig. 5.** Citotoxicidad in vitro de la NP 5-FU-poli(ϵ -caprolactona) en comparación para el agente 5-FU libre en las líneas de cáncer de colon T84(a), HT-29 (b), HCT-15 (c), CCD-18 (d), y MC38(e). El grado de inhibición del crecimiento se midió en 72 horas usando el ensayo de SRB. El porcentaje de supervivencia se determinó mediante la normalización de la absorbancia de los
10 controles a 100%. Además, los NP y libre de 5-FU se utilizan conjuntamente para demostrar la no-interacción. Los datos se representan como valor medio $\pm$ SD de los cultivos por cuadruplicado.

Fig. 6. Inhibición del crecimiento de un tumor inducido subcutáneamente mediante la inoculación de una línea derivada de cáncer de colon. Los tumores
15 fueron tratados con Np 5-FU-poli(butircianoacrilato) (a) y Np 5-FU-poli(ϵ -caprolactona) (b) y se compararon con el tratamiento con 5-FU libre y Np sin carga. El gráfico muestra una reducción estadísticamente significativa en el volumen tumoral de los ratones tratados con 5-FU-poli(butircianoacrilato) (a) o Np 5-FU-poli(ϵ -caprolactona) (b) en relación a los tumores no tratados, tratados
20 con NP vacías o tratados 5-FU libre. Los datos representan una media $\pm$ S.E.M. (n = 10).

Fig. 7. Estudio de la supervivencia de los ratones portadores de cáncer de colon tumor subcutáneo tratados con Np 5-FU-poli(butircianoacrilato) (a) y Np 5-FU-poli(ϵ -caprolactona) (b) en comparación con 5-FU libre y Np sin carga,
25 mediante la realización de las curvas de Kaplan-Meier. Los datos se analizaron de acuerdo con la supervivencia de los ratones con el tratamiento aplicado a cada grupo (n = 10). La comparación entre los grupos de tratamiento se realizó mediante el uso de la prueba de log-rank ($p < 0,05$).

30 **Descripción detallada de la invención**

Los inventores de la presente invención han desarrollado unas nanopartículas que se comportan como un excelente sistema transportador de análogos de pirimidina, y en concreto de 5-fluorouracilo. Las nanopartículas de la invención permiten una vehiculización óptima del agente anticanceroso, alcanzan una
 5 elevada extravasación en la masa tumoral y, a su vez, la liberación el fármaco es más controlada. Además, los estudios de eficacia antitumoral *in vitro* han demostrado un incremento muy significativo de la actividad antitumoral de este fármaco cuando es vehiculado a través de las nanopartículas de la invención.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula
 10 polimérica, de ahora en adelante nanopartícula de la invención, obtenible por un procedimiento que comprende:

- i) la disolución de al menos uno o más polímeros biodegradables, en un disolvente orgánico,
 - ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende
 15 un antisolvente y un tensoactivo, para obtener una partícula
 - iii) el aislamiento de la partícula obtenida, donde se incorpora el principio activo mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).
- 20 La asociación superficial consiste en la incorporación mediante adsorción del fármaco, en el caso de los ejemplos el fármaco antitumoral 5-fluorouracilo, en la superficie de las nanopartículas poliméricas previamente obtenidas. En la asociación en el interior de la matriz polimérica, el principio activo es incorporado en el interior de las nanopartículas mediante absorción.
- 25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el procedimiento además comprende una etapa de evaporación del disolvente orgánico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, además comprende una redispersión de la nanopartícula polimérica hasta que la conductividad del sobrenadante sea menor o igual a 10 $\mu\text{S/cm}$.

La conductividad del sobrenadante obtenido se puede determinar, por ejemplo pero sin limitarnos, a 25,0-0,5 °C utilizando un conductímetro Crison microPH 2001 (España). La redispersión del sedimento obtenido tras la centrifugación de las nanopartículas se puede realizar, por ejemplo pero sin limitarnos,
 5 mediante adición de agua bidestilada a este sedimento y exposición de esta mezcla (a 25,0-0,5 °C) a ultrasonidos (450 W, baño de ultrasonidos Branson 5200E4, EE.UU.).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante una centrifugación.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la etapa (ii) se realiza de manera secuencial.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el antisolvente es agua o agua mezclada con un disolvente orgánico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula
 15 tiene un tamaño de partícula medio de entre 30 y 500 nm., más preferiblemente de entre 30 y 999 nm, y aún más preferiblemente de entre 55 y 85 nm.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, al menos un polímero biodegradable es el poli(butilcianocrilato) o la poli(ε-caprolactona).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polímero
 20 biodegradable de poli(butilcianocrilato) tiene un peso molecular inferior a 10.000 Daltons, preferiblemente entre 3.000 y 100 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 2.000 y 500 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 1.500 Daltons, o donde el polímero biodegradable de poli(ε-caprolactona) tiene un peso molecular inferior a 100.000 Daltons,
 25 preferiblemente entre 5.000 y 45.000 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 7 y 20.000 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 10.000 Daltons.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula comprende como polímero biodegradable un 90% de poli(butilcianocrilato) o un
 30 75% de poli(ε-caprolactona).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula comprende al menos un análogo de pirimidina como principio activo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el poli(butilcianocrilato) y el análogo de pirimidina, o la poli(ϵ -caprolactona) y el
5 análogo de pirimidina están en un ratio suficiente para mantenerse asociados.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el ratio suficiente para mantenerse asociados el poli(butilcianocrilato) y el análogo de pirimidina es un ratio de entre 1000:1 y 1:100 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 5:1 y 15:1 p/p; o el ratio suficiente para mantenerse asociados la
10 poli(ϵ -caprolactona) y el análogo de pirimidina es un ratio de entre 1000:1 y 1:100 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 2:1 y 10:1 p/p.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la nanopartícula comprende un % de tensoactivo en un porcentaje de entre 0.2% y 5%.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el tensoactivo se
15 selecciona de lista que comprende: polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, polivinil alcohol de alto o bajo peso molecular, polivinilpirrolidona, fosfatidil colina, lecitinas, copolímeros en bloques anfifílicos, poloxameros de distintos tipos, solutol HS15, glicocolato sódico, taurocolato sódico, tauroglicocolato sódico, taurodeoxicolato sódico, hemisuccinato de colesterilo y tiloxapol.

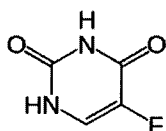
20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el tensoactivo es un copolímero en bloques anfifílicos, más preferiblemente es un poloxámero, y aún más preferiblemente es plurónico F68.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el análogo de pirimidina se selecciona de la lista que consiste en citarabina, fluorouracilo (5-
25 fluorouracilo o 5-FU), tegafur o ftorafur, carmofur, gemcitabina, capecitabina, azacitidina, decitabina, cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones. Aún más preferiblemente, es el 5-fluorouracilo (5-FU), o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos. Aún mucho más
30 preferiblemente, la nanopartícula de la invención comprende 5-fluorouracilo (5-FU) en un porcentaje de entre 0.1% y 25%.

Los “análogos de pirimidinas” constituyen un grupo bien definido en el código ATC o Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (instituido por la Organización Mundial de la Salud, y adoptado en Europa). Pertenecen a la sección ATC L01, sección del sistema de clasificación ATC dentro del grupo L, correspondiente a los agentes antineoplásicos e inmunomoduladores. En concreto se clasifican como L01BC Análogos de las pirimidinas, y en la última actualización de 2011 incluye:

- L01BC01 citarabina
- L01BC02 fluoracilo
- 10 - L01BC03 tegafur
- L01BC04 carmofur
- L01BC05 gemcitabina
- L01BC06 capecitabina
- L01BC07 azacitidina
- 15 - L01BC08 decitabina
- L01BC52 fluoracilo, combinaciones
- L01BC53 tegafur, combinaciones

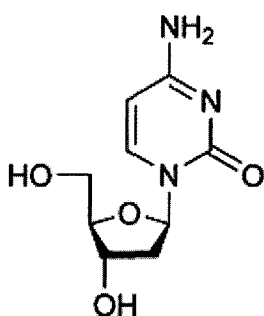
En esta memoria se entiende por fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5-FU), ó 5-Fluoropirimidina-2,4-diona, un compuesto con número CAS 51-21-8, de fórmula (I)



Fórmula (I),

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

En esta memoria se entiende por citarabina, Ara-C, arabinofuranosilcitosina; arabinosilcitosina, arabinosido de citosina, ó 4-amino-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-
5 dihidroxi-5- (hidroximetil)oxolan-2-il] pirimidin-2-ona, un compuesto con número CAS 147-94-4, de fórmula (II)



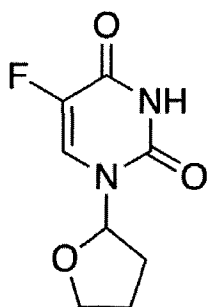
Fórmula (II),

10

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

En esta memoria se entiende por tegafur, ó (RS)-5-fluoro-1-(tetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, un compuesto con número CAS 17902-23-7, de fórmula (III)

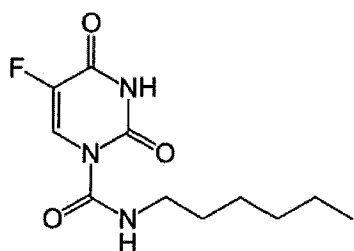
15



Fórmula (III),

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

- En esta memoria se entiende por carmofur, HCFU ó 5-fluoro-N-hexil-2,4-dioxo-
 5 pirimidine-1-carboxamida, un compuesto con número CAS 61422-45-5, de
 fórmula (IV)

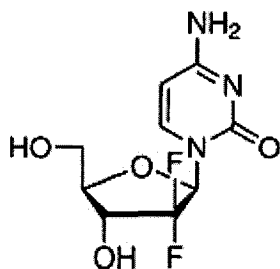


Fórmula (IV),

10

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

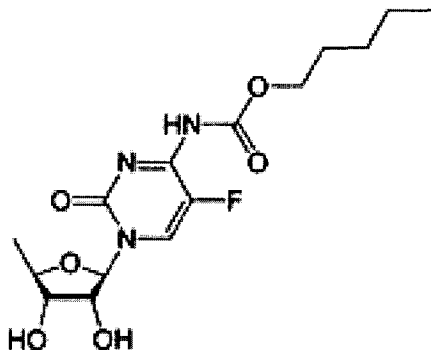
- En esta memoria se entiende por gemcitabina, ó 4-amino-1-(2-deoxi-2,2-
 difluoro-β-D-eritro-pentofuranosil)pirimidin-2(1H)-on, un compuesto con número
 15 CAS 95058-81-4, de fórmula (V)



Fórmula (V),

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

En esta memoria se entiende por capecitabina, ó pentil [1-(3,4-dihidroxi-5-metiltetrahidrofuran-2-il) -5-fluoro- 2-oxo-1H- pirimidin-4-il] carbamato, un
5 compuesto con número CAS 154361-50-9, de fórmula (VI)

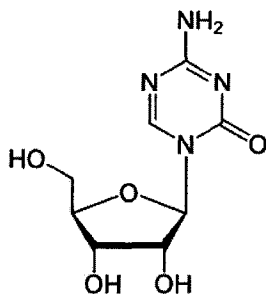


Fórmula (VI),

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

10

En esta memoria se entiende por azacitidina, ó 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona, un compuesto con número CAS 320-67-2, de fórmula
(VII)

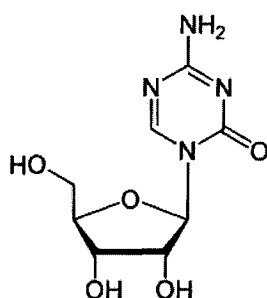


15

Fórmula (VII),

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

- 5 En esta memoria se entiende por decitabina, ó 4-amino-1-(2-deoxi-b-D-eritro-pentofuranosil)- 1,3,5-triazin-2(1*H*)-ona, un compuesto con número CAS 2353-33-5, de fórmula (VIII)



- 10 Fórmula (VIII),

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

- 15 Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, entre ellos, derivados del compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), y/o (VIII), que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

- 20 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos del compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), y/o (VIII) . El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado del compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), y/o (VIII), por

ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el efecto del compuesto de fórmula

5 (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), y/o (VIII), cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), y/o (VIII), en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica

10 siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), y/o (VIII), en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

15 En concreto, el procedimiento de síntesis de nanopartículas de la invención de poli(butircianocrilato) o poli(ϵ -caprolactona) se basa en el método de disposición interfacial de polímeros.

La disposición interfacial de polímeros es un procedimiento para la preparación de nanopartículas, o nanoesferas, biodegradables. En este método, el polímero

20 biodegradable se disuelve primero en un disolvente orgánico, por ejemplo acetona o diclorometano. La solución orgánica resultante se vierte bajo agitación en el agua que contiene surfactante, como por ejemplo un poloxámero, con que la fase acuosa de inmediato se convierte en una solución lechosa, indicando la formación de nanopartículas. El disolvente orgánico es

25 eliminado a presión reducida. La suspensión coloidal formada se concentra al volumen deseado.

El uso de la disposición interfacial de polímeros para la síntesis de las nanopartículas de la invención conlleva varias ventajas. Además de ser una síntesis sencilla y rápida, permite obtener nanopartículas con unas

30 características muy relevantes como: un sistema coloidal de tamaño muy pequeño con tamaños medios muy bajos. El proceso permite una carga de fármaco muy superior, lo que entre otras ventajas posibilita que la cantidad de

material polimérico administrada sea menor. Todo esto permite: i) que la masa a administrar de sistema transportador no sea muy elevada para obtener un efecto (antitumoral) significativo, en comparación con lo que ocurre con otros coloides previamente propuestos en otros trabajos; y, además, ii) un contacto
5 íntimo y muy prolongado entre la molécula terapéutica (antitumoral) y las células dianas (tumores).

Las nanopartículas de la presente invención pueden incluir otros principios activos, como por ejemplo, pero sin limitarnos, aquellos utilizados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (p.ej., arteriosclerosis,
10 trombosis), enfermedades metabólicas (p.ej., diabetes), enfermedades inflamatorias crónicas (p.ej., artritis, asma alérgico, uveitis), enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), o enfermedades infecciosas, entre otras.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición
15 farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende la nanopartícula de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica. En otra realización más preferida de este aspecto de la invención además comprende un excipiente farmacéuticamente
20 aceptable. Aún más preferiblemente, además comprende otro principio activo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica está formulada para su uso por vía parenteral, preferiblemente para su uso intravenoso, intraarterial, intratumoral, intramuscular o subcutáneo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición
25 farmacéutica está en forma sólida para administración oral, preferiblemente en comprimidos o cápsulas.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula de la invención o de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la nanopartícula de la invención o la
30 composición de la invención para su uso como medicamento.

Tanto la nanopartícula polimérica de la invención y la composición farmacéutica de la invención son útiles en terapia. Preferiblemente, son útiles para elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer, y más preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: linfoma de

5 Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de testículos, leucemia aguda, sarcoma de los tejidos suaves, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga urinaria, cáncer gástrico, cáncer de las tiroides, hepatocarcinoma, tumor de Wilms o neuroblastoma, entre otros, y aún más preferiblemente, para el tratamiento del cáncer de colon.

- 10 Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula de la invención o de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, o alternativamente, a la nanopartícula de la invención o la composición de la invención para para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida de
- 15 este aspecto de la invención, el cáncer es el cáncer colorrectal.

- Un quinto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de una nanopartícula con un tamaño medio inferior a 100 nm, preferiblemente inferior a 75 nm, que comprende uno o más polímeros degradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un polímero
- 20 biodegradable es el poli(butilcianocrilato) o el poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos un principio activo es el 5-fluorouracilo y que consiste en:

- i) la disolución de uno o más polímeros biodegradables, en un disolvente orgánico.
- ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende
- 25 un antisolvente y un tensoactivo
- iii) el aislamiento de la partícula obtenida, donde se incorpora el principio activo mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).

Para la medición del tamaño de partícula de las nanopartículas de la invención puede utilizarse el método de espectroscopía de correlación de fotones (PCS: *Photon Correlation Spectroscopy*).

El término polímero biodegradable hace referencia a una macromolécula orgánica (constituida por pequeñas moléculas llamadas monómeros) que es susceptible de ser destruida (degradada) *in vivo* bajo determinadas condiciones fisiológicas. De esta manera, es metabolizada y eliminada del organismo. Esta destrucción se produce principalmente bajo la acción de determinados enzimas o sistemas enzimáticos, p. ej., fosfolipasa A2, fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, transglutaminasa, fosfatasa alcalina, metaloproteinasa, esterases, etc. Algunos polímeros biodegradables son sensibles también a pHs ligeramente ácidos (p. ej., pH 6,6 característico del intersticio tumoral) o a la temperatura.

Como se utiliza aquí, el término "disolvente orgánico" se refiere a cualquier compuesto orgánico, o mezclas de compuestos orgánicos, capaz de disolver el poli(butilcianocrilato) o el poli(ϵ -caprolactona). Los ejemplos representativos incluyen alcoholes, hidrocarburos, compuestos halogenados, éteres y acetona. Ejemplos particulares de disolventes orgánicos son acetato de etilo, acetona, acetonitrilo (MeCN), benceno, cloroformo, cloruro de metileno, diclorometano (DCM), mezclas 1:1 de diclorometano:cloroformo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,4-dioxano, disolventes polares próticos, éter dietílico, tetrahidrofurano (THF), tolueno y (etanol, metanol, n-butanol, npropanol e isopropanol (IPA)).

El término "antisolvente" se refiere a un líquido que al mezclarse con un disolvente en el que un soluto se disuelve, es decir la poli(butilcianocrilato) o el poli(ϵ -caprolactona), reduce la capacidad del solvente orgánico para disolver el soluto. Así, cuando un antisolvente se mezcla con una solución de un soluto en un disolvente orgánico, la solubilidad del soluto se puede reducir hasta el punto en el que precipita en la solución. El antisolvente debe ser lo suficientemente miscible con el disolvente orgánico. Se apreciará que la miscibilidad puede ser controlada mediante la variación de uno o más parámetros, dentro de los que la solvencia entre el sistema y el antisolvente podrá mantenerse a una

temperatura suficientemente baja como para que los dos líquidos no sean particularmente miscibles (durante el almacenamiento, por ejemplo), y al aumentar la temperatura los dos líquidos pasen a ser miscibles y así puedan formarse las nanopartículas. El antisolvente preferido es una solución acuosa, si bien también pueden ser prefijadas soluciones acuosas aciduladas, como por ejemplo una solución de ácido acético al 2% (v/v) en agua.

El término agente "tensoactivo", o surfactante, hace referencia a los agentes activos de superficie que tienen una estructura caracterizada por un grupo polar hidrófilo y una cola hidrófoba. Estas moléculas superficiales activas tienen generalmente una cadena larga con al menos ocho átomos de carbono. Los tensoactivos son eficaces en la modificación de las propiedades de la interfase, como la tensión interfacial, a concentraciones muy bajas. Los tensoactivos también se caracterizan por ser capaces de modificar las propiedades termodinámicas superficiales (p. ej., hidrofobia), las propiedades de dispersión de la luz y la solubilización de solutos. En concreto, un aumento en la concentración de tensoactivo tiende a reducir significativamente la tensión superficial, hasta alcanzar un punto de interrupción conocido como concentración micelar crítica (CMC).

Cualquier agente tensoactivo eficaz puede ser utilizado en la práctica de la presente invención, incluyendo los tensoactivos aniónicos, no iónicos y catiónicos. Tensoactivos específicos útiles para la presente invención son polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, polivinil alcohol de peso molecular alto o bajo, polivinilpirrolidona, fosfatidil colina, lecitinas, poloxámeros, solutol HS15, glicocolato sódico, taurocolato sódico, tauroglicocolato sódico, taurodeoxicolato sódico, hemisuccinato de colesterilo y tiloxapol, preferiblemente polisorbato 80. Los tensoactivos más preferidos son los polaxámeros, preferiblemente un copolímero de poli(óxido de propileno) y de poli(óxido de etileno), y más preferiblemente pluronic® F-68.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas

y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

5 Caracterización de las nanopartículas. Especificaciones de su síntesis

Caprolactona: El procedimiento de síntesis se basa en el método de disposición interfacial de la poli(ϵ -caprolactona) (PCL), que implica la precipitación de este polímero en medio acuoso. El proceso de síntesis de las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) implica la adición de 5 ml de una
10 solución al 0.3% (p/v) de polímero en diclorometano sobre 25 ml de una solución acuosa de pluronic® F-68 del 2% (p/v).

El volumen de la fase orgánica donde se encuentra disuelto el polímero puede ser de hasta 50 ml (el volumen va en relación con el polímero, por lo que al
15 incrementar la cantidad de polímero), más preferiblemente 30 ml, y aún más preferiblemente de hasta 20 ml, la fase orgánica también puede estar constituida por acetona o etilacetato; de igual forma, el volumen de la fase acuosa puede ser de hasta 200 ml, mucho más preferiblemente de 120 ml, y aún más preferiblemente de hasta 100 ml (generalmente aproximadamente
20 unas 4 veces la fase orgánica). El agente tensoactivo utilizado puede ser también dextrano-70, mientras que la concentración utilizada de agente tensoactivo puede variar desde el 0.5 hasta el 3% (p/v). A partir de aproximadamnte un 1% (p/v) se logra la formación de las partículas con las características de la patente. A concentraciones superiores al 5% se forma
25 espuma. Bajo cualquiera de estas condiciones el tamaño de partícula permanece siempre por debajo de 100 nm (diámetro medio: 70 ± 15 nm, índice de polidispersión inferior a 1).

La adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa se realiza bajo agitación
30 mecánica (10000 rpm), la cual se mantiene durante 3 horas para asegurar la total precipitación del polímero en forma de nanopartículas. La velocidad de agitación mecánica puede ir desde 900 rpm hasta 20000 rpm, aún más

preferiblemente desde 1000 rpm hasta 18000 rpm, mientras que la agitación puede extenderse desde 0,5 horas hasta 7 horas, más preferiblemente desde 1 a 6 horas.

- 5 La fase orgánica se elimina completamente mediante evaporación con la ayuda de un rotavapor. Finalmente, la limpieza de las nanopartículas se realiza mediante el número necesario de ciclos de centrifugación (11000 rpm durante 30 minutos) y redispersión en agua bidestilada para que el sobrenadante obtenido sea transparente y presente una conductividad inferior a 10 $\mu\text{S/cm}$.

10

- Para la obtención de las nanopartículas de PCL cargadas con 5-FU, el fármaco antitumoral se disuelve en la fase orgánica (concentraciones molares utilizadas desde 10^{-7} hasta 10^{-2} M). Así se consigue una mayor absorción en la matriz polimérica, en comparación con su disolución en la fase acuosa. Por ejemplo,
- 15 para la concentración de 5-FU que proporciona la máxima vehiculización de fármaco en las condiciones de síntesis desarrolladas, los valores de eficacia de atrapamiento (*entrapment efficiency*, %) de 5-FU en las nanopartículas son: 82% si el 5-FU se disuelve en la fase orgánica (donde se encuentra también el polímero disuelto), y del 66% si el 5-FU se disuelve en la fase acuosa. Por lo
 - 20 demás, el procedimiento de preparación coincide con la rutina de síntesis descrita previamente.

- Cianoacrilato: El procedimiento de síntesis se basa en el método de disposición interfacial del monómero butilcianoacrilato, que implica supolimerización en un
- 25 medio acuoso. El proceso de síntesis consiste en la adición de 0.1 ml de una solución de acetona que contiene una concentración del 1% (p/v) de monómero sobre 10 ml de una solución acuosa de HCl 10^{-4} N que contiene un 1% (p/v) de pluronic® F-68.

- 30 El volumen de la fase orgánica donde se encuentra disuelto el monómero puede ser de hasta 12 ml, más preferiblemente de hasta 10 ml, la fase orgánica también puede estar constituida por etanol; de igual forma, el volumen de la fase acuosa puede ser de hasta 600 ml, preferiblemente de hasta 500 ml. El agente tensoactivo utilizado puede ser también dextrano-70 o poli(etilenglicol)

4000, mientras que la concentración utilizada de agente tensoactivo puede variar desde el 0.2 hasta el 5% (p/v). Bajo cualquiera de estas condiciones el tamaño de partícula permanece siempre por debajo de 100 nm (diámetro medio: 75 ± 10 nm, índice de polidispersión inferior a 1

5

La adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa se realiza bajo agitación mecánica (10000 rpm), la cual se mantiene durante 6 horas para asegurar la completa transformación del monómero en nanopartículas de polímero. Para finalizar la reacción, se adiciona cantidad suficiente de una base (p.ej., NaOH 1 M, KOH 1 M) para neutralizar (pH 7) el medio de polimerización.

10

La velocidad de agitación mecánica puede ir desde 800 rpm hasta 20000 rpm, y más preferiblemente desde 1000 rpm hasta 18000 rpm, mientras que la agitación puede extenderse desde 0.5 a 12 horas.

15

La fase orgánica se elimina completamente mediante evaporación con la ayuda de un rotavapor. Finalmente, la limpieza de las nanopartículas se realiza mediante el número necesario de ciclos de centrifugación (11000 rpm durante 30 minutos) y redispersión en agua bidestilada para que el sobrenadante obtenido sea transparente y presente una conductividad inferior a $10 \mu\text{S/cm}$.

20

Para la obtención de las nanopartículas de PBCA cargadas con 5-fluorouracilo (5-FU), el fármaco antitumoral se disuelve en la fase orgánica (concentraciones molares utilizadas desde 10^{-7} hasta 10^{-2} M). Así se consigue una mayor absorción en la matriz polimérica, en comparación con su disolución en la fase acuosa. Por ejemplo, para la concentración de 5-FU que proporciona la máxima vehiculización de fármaco en las condiciones de síntesis desarrolladas, los valores de eficacia de atrapamiento (*entrapment efficiency*, %) de 5-FU en las nanopartículas son: 73% si el 5-FU se disuelve en la fase orgánica (donde se encuentra también el polímero disuelto), y del 59% si el 5-FU se disuelve en la fase acuosa. Por lo demás, el procedimiento de preparación coincide con la rutina de síntesis descrita previamente. Finalmente, la concentración de HCl fijada en el medio de polimerización también influye en la vehiculización de 5-FU por las nanopartículas de PBCA. En concreto, se logra incorporar este agente antitumoral en las nanopartículas cuando los valores de concentración

25

30

de HCl se encuentran entre 10^{-5} y 10^{-2} N, preferiblemente 10^{-4} N (eficacia de atrapamiento: 73%, frente a la mínima obtenida para una concentración de HCl 10^{-2} N: 18%). Por lo tanto, puede decirse que la modificación del pH influye en la absorción de 5-FU por las nanopartículas. En concreto, el pH determina la cinética de polimerización del monómero, la cual está gobernada por la cantidad de iones hidroxilo presentes en el medio. Conforme esta concentración es menor (medios de polimerización ácidos, concentraciones altas de HCl), la velocidad de polimerización decrece y, así, la absorción de fármaco. Es decir, cuanto más rápidamente transcurra la reacción de polimerización más cantidad de 5-FU (fármaco hidrófilo) quedará atrapado en la nanomatriz hidrófoba de PBCA, pues no tendrá margen para escapar al medio acuoso donde transcurre el proceso. Por otro lado, una cinética de polimerización excesivamente rápida (existente a concentraciones de HCl inferiores a 10^{-5} N, pH 6 y superiores) conduce a un mal proceso de formación de las nanopartículas de PBCA, obteniéndose principalmente macroagregados sólidos que no sirven como nanosistemas transportadores de 5-FU.

Estudio de la citotoxicidad

La nueva nanopartícula de PBCA sin fármaco no mostró toxicidad en las líneas celulares derivadas de colon que fueron ensayadas (T84, HT-29 y CCD-18, MC-38) después de un tiempo de incubación de 72 h (Fig. 3a) y en cualquiera de las concentraciones probadas (Fig. 3a). Por otra parte, la nueva nanopartícula de PCL sin fármaco tampoco mostró toxicidad en las mismas líneas celulares derivadas de colon ensayadas (T84, HT-29 y CCD-18, MC-38) y con los mismos tiempos de incubación (Fig. 3b) y concentraciones (Fig. 3b). Estas concentraciones incluyen las adecuadas para ser utilizadas cargadas con fármaco en experiencias in vivo lo que indica la posible utilización del nuevo agente como fármaco terapéutico.

Efecto antiproliferativo de poli(butilcianoacrinolato) y poli(ϵ -caprolactona) cargadas con 5-fluorouracilo.

Con todas las nanopartículas y con todas las líneas celulares, se obtuvo un incremento del efecto antiproliferativo a las 72 h de incubación (Fig. 4) en relación al uso del agente 5-fluorouracilo sin nanopartícula.

- La nanopartícula PBCA-5-FU es capaz de reducir el valor de CI50 (dosis que elimina el 50% del de las células del cultivo) con respecto al tratamiento con 5-FU. Esto implica una enorme mejora en la actividad antitumoral del agente. PBCA-5-FU (1 mM) indujo un aumento de 61,9%, 35% y 62,2% de RI en las células de cáncer de colon T-84, HT-29 y HCT-15, respectivamente ($p < 0,05$) y por lo tanto una reducción significativa en el valor de IC50 de 5-FU respecto a 5-FU libre lo que supone la posibilidad de reducir la dosis de fármaco para obtener el mismo efecto. Debemos destacar el aumento de 70,2% de RI en la línea MC-38 con la misma nanopartícula (PBCA-5-FU) usándola a 0,03 mM (Fig. 4).

- Las nanopartículas PCL-5-FU se comportaron de forma similar a PBCA-5-FU. Las Np de PCL-5-FU alcanzaron un nivel máximo de inhibición de RI% en relación con el 5-FU libre a la concentración de 0,1 mM para T84 (61,9%), 1 mM para HT-29 (27,5%), HCT-15 (69,3%) y CCD-18 (38,24%) y 0,03 mM para MC-38 (76,2%) ($p < 0,05$) (Fig. 5).

Comportamiento de las nanopartículas contra el p-glicoproteína.

Nuestros resultados demuestran que nuestras nanopartículas no impiden que esta bomba de eflujo actúe sobre 5-FU.

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* con poli(butilcianoacrilato) y poli(ϵ -caprolactona) nanopartículas cargadas con 5-fluorouracilo.

El tratamiento con nanopartículas cargadas con 5-FU en ratones con tumores de colon inducidos con un seguimiento de 45 días demostró una reducción significativa del volumen de los mismos (Fig. 6).

- Así, PBCA-5-FU es capaz de reducir significativamente el volumen del tumor (valor de $p < 0,05$) respecto a 5-FU desde el día 27 hasta el final del experimento (Fig. 6). Específicamente esta reducción fue de un 50,8% el día

45. El grupo de ratones tratados con PCL-5-FU también presentan una reducción significativa del volumen del tumor para comparar con 5-FU (valor de $p < 0,05$) desde el día 27 hasta el último día de tratamiento (Fig. 6).

- PCL-5-FU el resultado fue aún mejor con una reducción del 64,4% del volumen tumoral en el día 45 en comparación con el 5-FU. PCL-5-FU logra una mayor reducción significativa en el tumor volumen que PBCA-5-FU (p -valor $< 0,05$).

-Por otra parte, los grupos de ratones tratados con nanopartículas de PBCA y PCL sin drogas, no difieren de manera significativa con el grupo de control, indicando que no hay toxicidad *in vivo* de estas nanopartículas.

Supervivencia de los ratones.

A pesar de una reducción considerable en el volumen del tumor, 5-FU falla para aumentar la probabilidad de supervivencia de los ratones tratados con este fármaco en comparación con los ratones control y los tratados con la nanopartícula sin fármaco (Fig. 7). Sin embargo, esto no ocurre con los ratones tratados con nanopartículas que llevan 5-FU.

De acuerdo con la prueba de log-rank hay diferencias significativas de los tiempos de supervivencia (p -valor $< 0,05$) entre los ratones tratados con PBCA-5-FU (Fig. 5) y PCL-5-FU (Fig. 7) y los grupos de ratones controles, tratados con 5-FU y tratados con nanopartículas sin fármaco. Estos grupos no mostraron diferencias significativas entre los tiempos de supervivencia, incluso en el caso de los ratones tratados con 5-FU (valor $p > 0,05$). Esto demuestra que, además de aumentar la reducción en el volumen del tumor, las nanopartículas también son capaces de mejorar la supervivencia de los ratones.

Conclusión: Se presenta el desarrollo original de dos nuevas nanopartículas de poli(butilcianocrilato) y poli(ϵ -caprolactona) que asociadas al agente 5-FU han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*:

1) Aumentar la actividad antiproliferativa del fármaco hasta en 61,9% midiendo el %RI-inhibición relativa de crecimiento- en células tumorales derivadas de cáncer de colon y en relación al agente 5-fluorouracilo

2) Reducir hasta en un 50,8% el volumen de tumores de cáncer de colon desarrollados en ratones en relación a la actividad del agente 5-fluorouracilo sin nanopartícula.

3) Aumentar de forma significativa el tiempo de supervivencia de los
5 ratones con tumores en relación al tratamiento con el del agente 5-fluorouracilo sin nanopartícula.

4) las nanopartículas desarrollas no muestran ningún tipo de toxicidad.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una nanopartícula polimérica obtenible por un procedimiento que comprende:
- 5 i) la disolución de al menos uno o más polímeros biodegradables, en un disolvente orgánico,
- ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo, para obtener una partícula
- 10 iii) el aislamiento de la partícula obtenida, donde se incorpora el principio activo mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).
- 2.- La nanopartícula polimérica según la reivindicación anterior, donde el procedimiento además comprende una etapa de evaporación del disolvente orgánico.
- 15 3.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la etapa (iii) se lleva a cabo mediante una centrifugación.
- 4.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende una redispersión de la nanopartícula polimérica hasta
- 20 que la conductividad del sobrenadante sea menor o igual a 10 $\mu\text{S/cm}$.
- 5.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la etapa (ii) se realiza de manera secuencial.
- 6.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el antisolvente es agua o agua mezclada con un disolvente orgánico.
- 25 7.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque la nanopartícula tiene un tamaño de partícula medio de entre 30 y 500 nm., más preferiblemente de entre 30 y 999 nm, y aún más preferiblemente de entre 55 y 85 nm.

8.- La nanopartícula polimérica según las reivindicación 1-7, donde el al menos un polímero biodegradable es el poli(butilcianocrilato) o la poli(ε-caprolactona).

9.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el polímero biodegradable de poli(butilcianocrilato) tiene un peso molecular inferior a 10.000 Daltons, preferiblemente entre 3.000 y 100 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 2.000 y 500 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 1.500 Daltons, o donde el polímero biodegradable de poli(ε-caprolactona) tiene un peso molecular inferior a 100.000 Daltons, preferiblemente entre 5.000 y 45.000 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 7 y 20.000 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 10.000 Daltons.

10.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende como polímero biodegradable un 90% de poli(butilcianocrilato) o un 75% de poli(ε-caprolactona).

11.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende al menos un análogo de pirimidina como principio activo.

12.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el poli(butilcianocrilato) y el análogo de pirimidina, o la poli(ε-caprolactona) y el análogo de pirimidina están en un ratio suficiente para mantenerse asociados.

13.- La nanopartícula polimérica según reivindicación 12, donde el ratio suficiente para mantenerse asociados el poli(butilcianocrilato) y el análogo de pirimidina es un ratio de entre 1000:1 y 1:100 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 5:1 y 15:1 p/p; o el ratio suficiente para mantenerse asociados la poli(ε-caprolactona) y el análogo de pirimidina es un ratio de entre 1000:1 y 1:100 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 2:1 y 10:1 p/p.

14.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende un % de tensoactivo en un porcentaje de entre 0.2% y 5%.

- 15.- La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el tensoactivo se selecciona de lista que comprende: polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, polivinil alcohol de alto o bajo peso molecular, polivinilpirrolidona, fosfatidil colina, lecitinas, copolímeros en bloques anfifílicos, poloxameros de distintos tipos, solutol HS15, glicocolato sódico, taurocolato sódico, tauroglicocolato sódico, taurodeoxicolato sódico, hemisuccinato de colestero y tiloxapol.
16. La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el tensoactivo es un copolímero en bloques anfifílicos.
- 17.- La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde el tensoactivo es un copolímero en bloques anfifílicos es un poloxámero.
- 18.- La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el poloxámero es plurónico F68.
- 19.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el análogo de pirimidina se selecciona de la lista que consiste en citarabina, fluorouracilo (5-fluorouracilo o 5-FU), tegafur o ftorafur, carmofur, gemcitabina, capecitabina, azacitidina, decitabina, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones.
- 20.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el análogo de pirimidina es el 5-fluorouracilo (5-FU), o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.
- 21.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 5-fluorouracilo en un porcentaje de entre 0.1% y 25%.
- 22.- Una composición que comprende una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-21.
- 23.- La composición según la reivindicación 22, que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

24.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 22-23, que además comprende otro principio activo.

25.- El uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en la elaboración de un medicamento.

- 5 26.- El uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

27.- El uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el cáncer es el cáncer de colon.

- 10 28.- Un método para la síntesis de una nanopartícula polimérica con un tamaño medio inferior a 100 nm, preferiblemente inferior a 75 nm, que comprende uno o más polímeros degradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde el al menos un polímero biodegradable es el poli(butilcianocrilato) o el poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos un principio
15 activo es un análogo de pirimidina, y que comprende:

- i) la disolución de al menos uno o más polímeros biodegradables, en un disolvente orgánico,
- ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo, para obtener una partícula
- 20 iii) el aislamiento de la partícula obtenida, donde se incorpora el principio activo mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).

Fig. 1

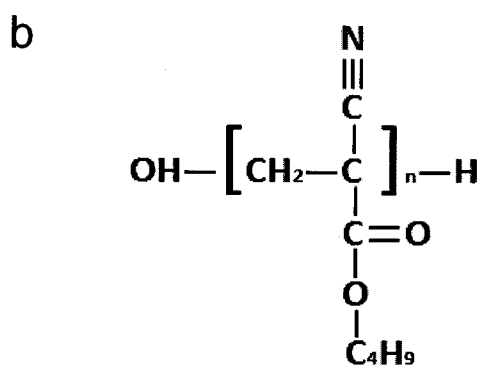
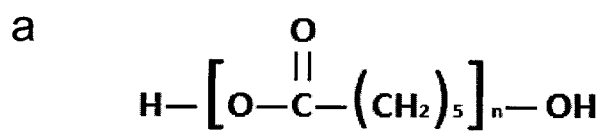


Fig. 2

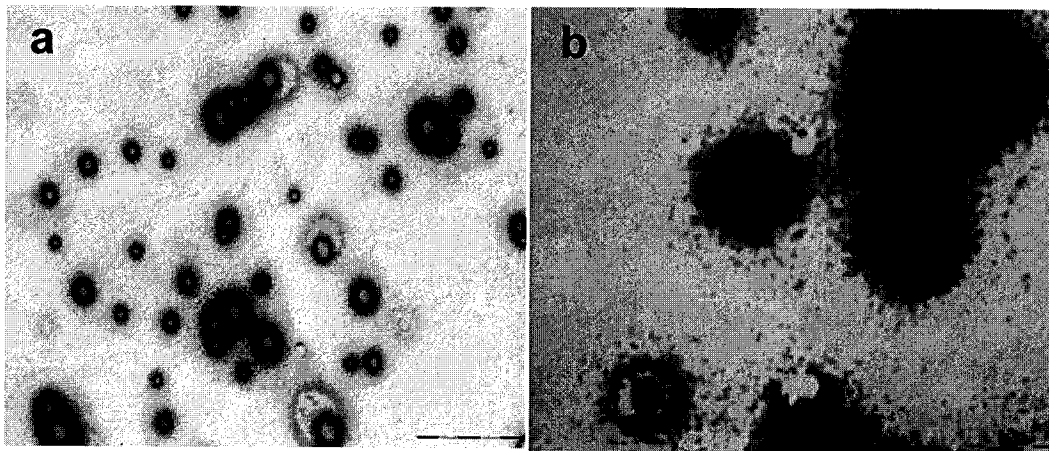


Fig.3

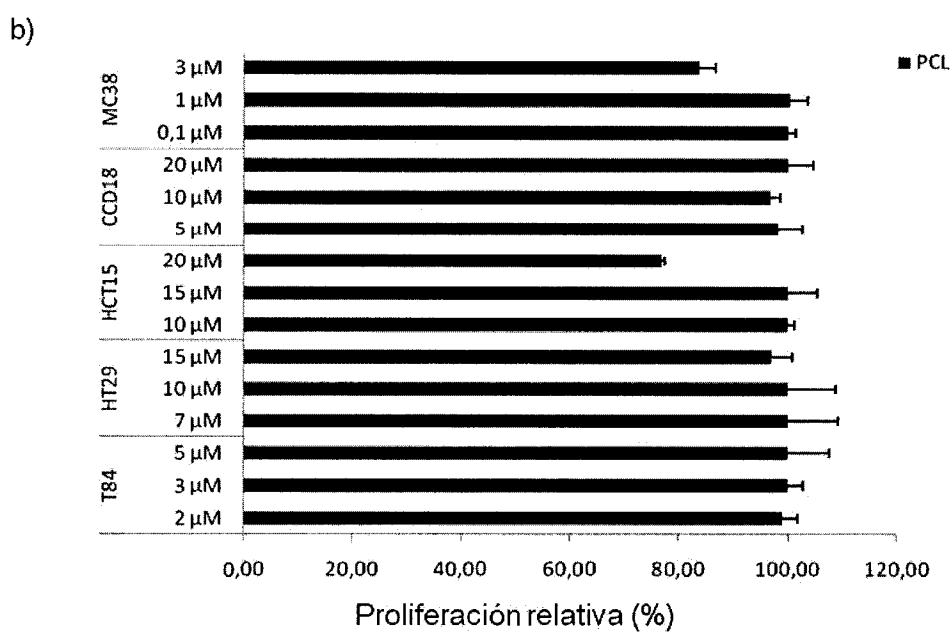
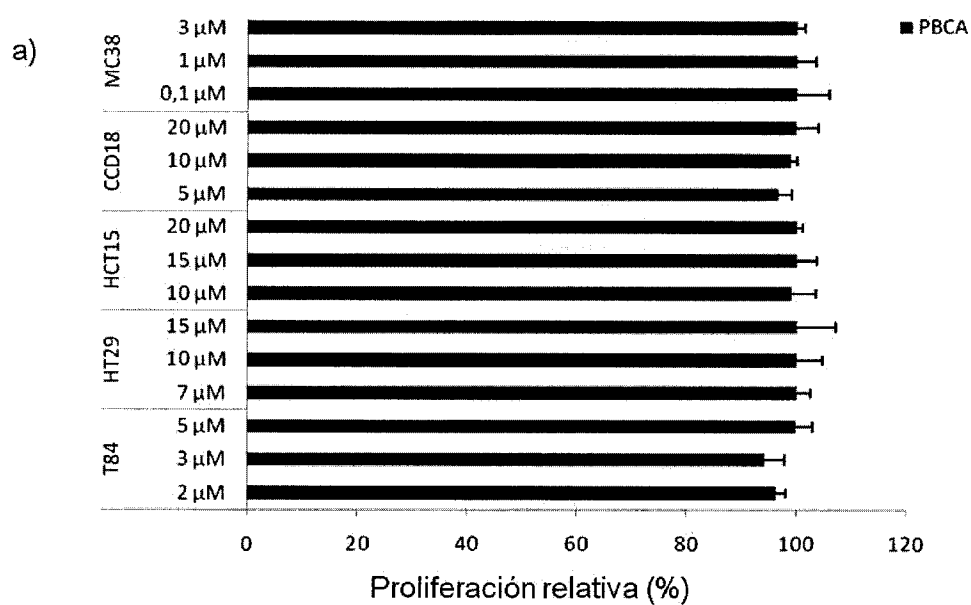


Fig.4

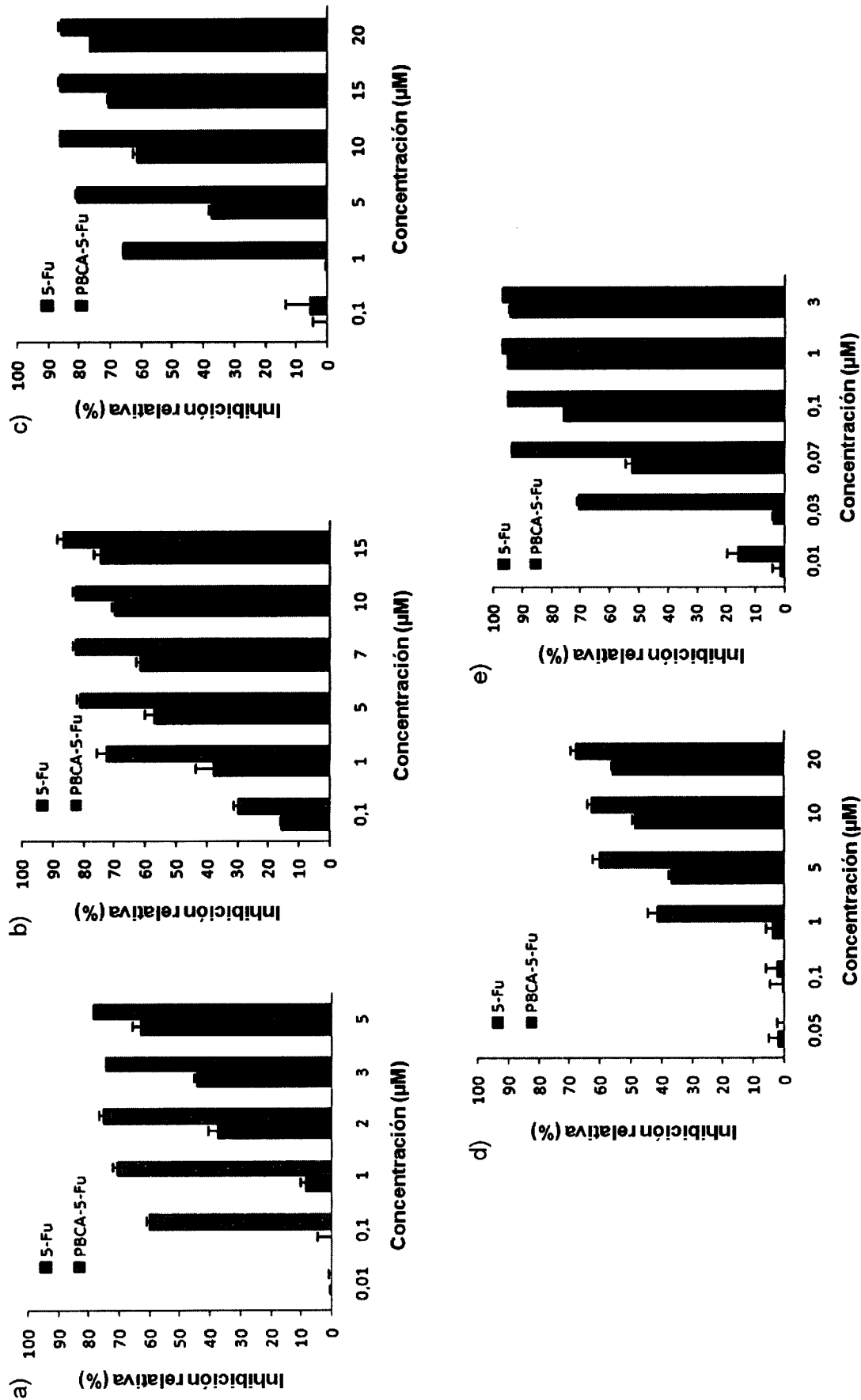


Fig. 5

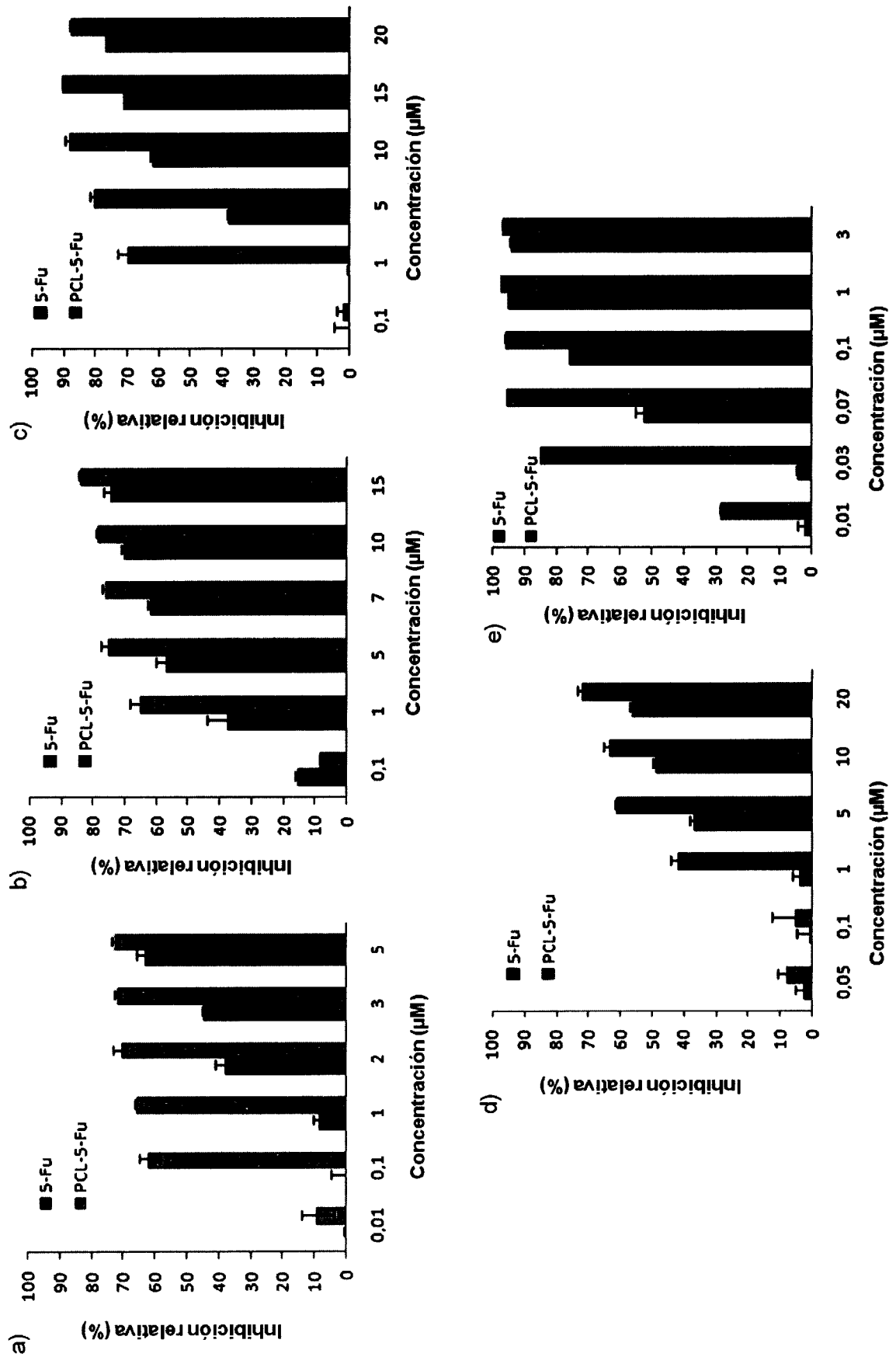


Fig. 6

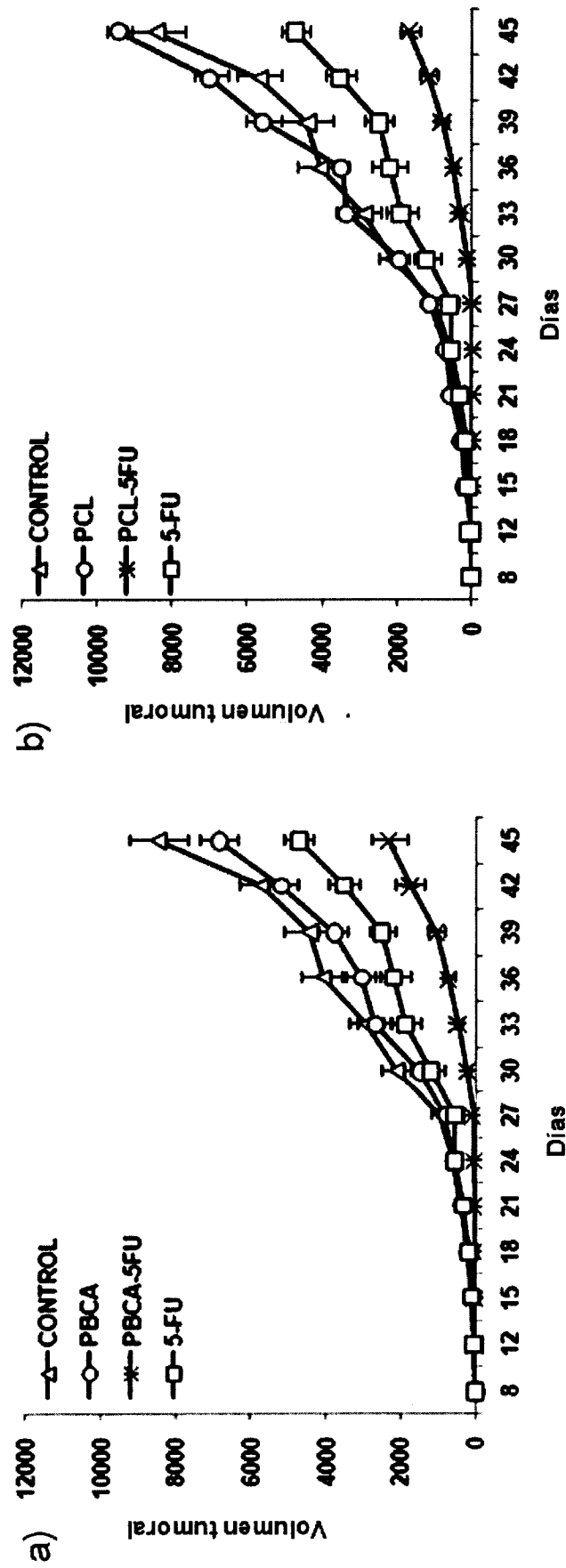


Fig. 7

