

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 850**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2018** **PCT/IB2018/050757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2018** **WO18146599**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2018** **E 18708744 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3565534**

54 Título: **Nanopartículas poliméricas que encapsulan una combinación de bioactivos naturales trans-resveratrol (RSV) y celastrol (CL), un procedimiento para la preparación y uso de las mismas en el tratamiento del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

10.02.2017 IT 201700015178

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

09.03.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI (100.0%)
Piazza Università n. 21
07100 Sassari, IT

72 Inventor/es:

SANNA, VANNA;
SECHI, MARIO;
SIDDIQUI, IMTIAZ AHMAD y
MUKHTAR, HASAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 810 850 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas poliméricas que encapsulan una combinación de bioactivos naturales *trans*-resveratrol (RSV) y celastrol (CL), un procedimiento para la preparación y uso de las mismas en el tratamiento del cáncer de próstata

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a nanopartículas poliméricas para la administración combinada de varias sustancias de origen natural para el tratamiento del cáncer de próstata.

10 Específicamente, la presente invención se refiere a nanopartículas poliméricas basadas en una mezcla de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-poli(etilenglicol) (PLGA-PEG) cargada con cantidades adecuadas de resveratrol y celastrol. La invención se refiere también a la preparación de dichas nanopartículas poliméricas cargadas con resveratrol y celastrol y a su uso para transportar dichas sustancias activas en el tratamiento del cáncer de próstata.

Antecedentes de la técnica

15 Aunque varias sustancias de origen natural tienen una actividad farmacológica prometedora frente a diferentes tipos de cáncer, su eficacia está a menudo severamente limitada por una serie de limitaciones debidas, por ejemplo, a su inestabilidad estructural, baja solubilidad, liberación sistémica no eficiente, baja biodisponibilidad y/o toxicidad intrínseca cuando se administran como tales. En un intento de remediar estas limitaciones, se han dirigido varios estudios a la identificación de sistemas adecuados, en particular nanosistemas, para la administración más adecuada de estas sustancias.

20 Por ejemplo, se han estudiado nanopartículas basadas en diferentes materiales poliméricos, tales como PLGA poli(ácido láctico-co-glicólico), derivados de celulosa, dendrímeros, ciclodextrinas, para aumentar la actividad citotóxica de la curcumina frente a las células de cáncer de próstata (Thangapazham R.L. *et al.*, Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. International Journal of Oncology. 2008;32(5): 1119- 1123).

25 Recientemente, Sanna y colaboradores han propuesto un nanosistema polimérico que consiste en una mezcla de policaprolactona y PLGA-PEG, para la liberación controlada de resveratrol en varias líneas de células de cáncer de próstata (Sanna V. *et al.*, Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. Mol. Pharm. 2013 Oct 7; 10(10):3871-81).

30 Recientemente, Sanna y colaboradores han propuesto un nanosistema polimérico, basado en policaprolactona, para la liberación controlada de celastrol en varias líneas de células de cáncer de próstata (Sanna V. *et al.*, Nanoencapsulation of natural triterpenoid celastrol for prostate cancer treatment. Int. J. Nanomedicine. 2015 Oct. 30; 10:6835-6846).

35 Últimamente, entre las estrategias emergentes para el tratamiento del cáncer, se ha centrado un gran interés en la combinación de uno o más agentes quimioterapéuticos sintéticos con moléculas de origen natural que tienen una actividad quimiopreventiva, con el objetivo de poder asegurar una mejor eficacia de tratamientos y una reducción de los efectos secundarios en comparación con las monoterapias utilizadas en los protocolos convencionales. Además, se espera que la posibilidad de combinar diferentes moléculas anti-cáncer y agentes quimiopreventivos naturales pueda ofrecer la ventaja de prevenir la aparición del fenómeno de resistencia a los fármacos por parte de las células cancerosas, que representa una limitación de las terapias utilizadas actualmente. Sin embargo, a pesar de las interesantes actividades quimiopreventivas mostradas por diferentes moléculas de origen natural frente al cáncer de

40 próstata, y la mejora de la eficacia de los tratamientos de diferentes tipos de cáncer observadas utilizando una combinación de moléculas sintéticas con moléculas naturales, su aplicación terapéutica sigue siendo bastante limitada.

Según el conocimiento de los presentes inventores, hasta la fecha las terapias de combinación estudiadas para obtener un aumento y/o en general una mejora de la actividad anti-cáncer consisten principalmente en el uso de una molécula natural en asociación con agentes quimioterapéuticos sintéticos.

45 Por el contrario, no se conocen publicaciones ni patentes que describan la preparación de un sistema único de nanopartículas poliméricas cargadas con al menos dos o más moléculas diferentes de origen natural, con actividad antiproliferativa/anti-cáncer, en particular para el tratamiento (prevención y/o terapia) del cáncer de próstata.

Problema técnico

50 Por lo tanto, los técnicos en la materia sienten una gran necesidad de tener nuevos sistemas para transportar y liberar (posiblemente de manera controlada) una combinación de varios compuestos naturales, que tengan una actividad citotóxica válida, en particular frente a las células de cáncer de próstata, capaces de realizar una acción quimiopreventiva/anti-cáncer y de obtener un aumento significativo y/o una mejora general en la actividad de las moléculas bioactivas utilizadas, junto con una mejora en la calidad de vida de los pacientes de cáncer.

El objeto de la presente invención es proporcionar una respuesta adecuada al problema técnico anterior.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han encontrado ahora de forma inesperada que una combinación adecuada de al menos dos moléculas de origen completamente natural, una con una actividad quimiopreventiva reconocida y la otra con una acción citotóxica más marcada, incorporadas/encapsuladas en un sistema unitario adecuado de nanopartículas poliméricas, permite aumentar la actividad anti-cáncer de dicha combinación con respecto a la de las moléculas individuales, consideradas tanto como tales como encapsuladas individualmente en el nanosistema, y mejorar significativamente la acción antiproliferativa en las líneas de células de cáncer de próstata, con el potencial de prevenir y/o limitar la inducción de efectos tóxicos y/o sistémicos indeseables, demostrando así que puede dar una respuesta adecuada al problema técnico mencionado anteriormente.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención son las nanopartículas poliméricas biocompatibles (en adelante NP como acrónimo) basadas en una mezcla de poli(ϵ -caprolactona) (en adelante, PCL como acrónimo) y un conjugado poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-poli(etilenglicol) (en adelante PLGA-PEG-COOH como acrónimo) cargado con una combinación de *trans*-resveratrol (en adelante RSV como acrónimo) y celastrol (en adelante CL como acrónimo), como se expone en las reivindicaciones independientes adjuntas.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas poliméricas anteriores, como se expone en las reivindicaciones independientes adjuntas.

Aún otro objeto de la presente invención es un método para la preparación de dichas nanopartículas poliméricas mencionadas antes, como se expone en las reivindicaciones independientes adjuntas.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de dichas nanopartículas poliméricas mencionadas antes para el tratamiento del cáncer de próstata, como se expone en las reivindicaciones independientes adjuntas.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Las realizaciones preferidas de la presente invención mostradas en la siguiente descripción se describen en la presente memoria solo a modo de ejemplo no limitativo del amplio alcance de aplicación de la invención, que será evidente para los expertos en la técnica.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se describirá de aquí en adelante a modo de ejemplo sin limitar de ningún modo el alcance de la misma, ilustrando algunas realizaciones preferidas de la misma. Con este fin, para resaltar mejor el potencial y las peculiaridades de las nanopartículas poliméricas de la presente invención, también se hará referencia a la Figura 1 adjunta.

La Figura 1 muestra la comparación entre la viabilidad de las líneas de células de cáncer de próstata ensayadas (células C-42 (a & b); células DU-145 (c & d); y células PC-3 (e & f)) tratadas durante 72 horas sólo con RSV a diferentes dosis (20, 30 y 40 μ M); sólo con CL a diferentes dosis (0,250, 0,375 y 0,5 μ M); con RSV + CL en combinación a diferentes dosis (RSV 20 μ M + CL 0,25 μ M, RSV 30 μ M + CL 0,375 μ M y RSV 40 μ M + CL 0,5 μ M); y también tratadas con NP sin carga (vacías), NP cargadas sólo con RSV, NP cargadas sólo con CL y NP cargadas con RSV + CL en combinación con las mismas dosis indicadas antes ($n = 3$ o 5).

Descripción detallada de la invención

Introducción

El *trans*-resveratrol o *trans*-3,5,4'-trihidroxi-estilbeno (RSV) es un polifenol no flavonoide extraído principalmente de la raíz de *Polygonum Cuspidatum* (una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Polygonaceae) y comúnmente contenido también en algunas frutas como las uvas rojas, moras, arándanos, frambuesas y cacahuetes.

Esta fitoalexina, ampliamente utilizada en la medicina tradicional china, producida por las plantas en respuesta al estrés climático y en defensa frente a patógenos tales como bacterias u hongos, es bien conocida por sus efectos antioxidantes, antienvjecimiento, antiinfecciosos y protectores a nivel cardiovascular y neurológico. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la eficacia del RSV como agente preventivo con una reducción significativa en la formación y progresión del cáncer de próstata.

El celastrol (CL), un compuesto triterpenoide extraído de la corteza de la raíz de la planta *Tripterygium wilfordii*, ampliamente utilizado en la medicina tradicional china, ha mostrado actividades interesantes para el tratamiento de afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el tratamiento con CL produce la inhibición de la actividad del proteasoma y la inducción de la apoptosis en las células de cánceres de próstata PC-3 (receptores de andrógenos o AR negativos) y LNCaP (AR-positivos).

Desafortunadamente, el posible uso farmacológico de RSV y CL, a pesar de sus interesantes actividades anti-cáncer, está fuertemente limitado debido a la baja biodisponibilidad de estas moléculas que resulta, entre otras cosas, de su baja solubilidad en agua (la solubilidad de RSV es de 3 mg/100 mL, mientras que CL es insoluble), la inestabilidad química, que, por ejemplo, en el caso de RSV, provoca la conversión del isómero *trans* biológicamente activo en su forma *cis* inactiva, y una cierta toxicidad sistémica, en particular de CL.

Descripción

Por lo tanto, son un objeto de la presente invención nanopartículas poliméricas (NP) biocompatibles para la co-liberación controlada de los principios activos *trans*-resveratrol (RSV) y celastrol (CL), que comprenden al menos:

- una mezcla polimérica biocompatible de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y el copolímero conjugado poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-poli(etilenglicol) (PLGA-PEG-COOH); y
- una cantidad eficaz de una mezcla de *trans*-resveratrol (RSV) y celastrol (CL).

Opcionalmente, dichas NP comprenden además una cantidad eficaz de al menos un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en: poloxámeros, Pluronic® F-127, polisorbatos, Tween® 80, alcohol polivinílico, PVA; preferiblemente, Pluronic® F-127 y PVA; más preferiblemente Pluronic® F-127.

En las nanopartículas de la presente invención, en dicha mezcla polimérica biocompatible, los dos polímeros componentes están presentes en una relación recíproca en masa PCL:PLGA-PEG-COOH comprendida entre 3:0,5 a 0,5:2; preferiblemente, 1,5:1.

En las nanopartículas de la presente invención, en dicha mezcla de los dos principios activos (RSV y CL),

- RSV está presente a una concentración de 5 μ M a 50 μ M; preferiblemente, de 10 μ M a 45 μ M; más preferiblemente, de 20 μ M a 40 μ M. En realizaciones preferidas de la invención, dicha concentración de RSV es 20 μ M y/o 25 μ M y/o 30 μ M y/o 35 μ M y/o 40 μ M; y
- CL está presente a una concentración de 0,050 μ M a 5,000 μ M; preferiblemente, de 0,150 μ M a 2,000 μ M; más preferiblemente, de 0,250 μ M a 0,500 μ M. En realizaciones preferidas de la invención, dicha concentración de CL es 0,250 μ M y/o 0,325 μ M y/o 0,375 μ M y/o 0,425 μ M y/o 0,500 μ M.

Las nanopartículas poliméricas de la presente invención tienen una forma esférica y tienen una media de diámetro hidrodinámico (es decir, el diámetro de la capa de dipolo eléctrico unida a la superficie de la partícula dispersada en un fluido) que varía de 50 nm a 350 nm; preferiblemente, de 100 nm a 300 nm; más preferiblemente, de 150 nm a 250 nm. En una realización preferida de la invención, dicho diámetro hidrodinámico medio es de aproximadamente 180-200 nm. En las nanopartículas de la presente invención, dicho tensioactivo opcional está presente en solución acuosa a una concentración que varía de 0 % a 2,0 % en peso, con respecto al peso del disolvente acuoso; preferiblemente de 0,05 % a 1,0 % en peso; más preferiblemente, de 0,1 % a 0,5 % en peso. En una realización preferida de la invención, dicho tensioactivo está presente a una concentración de 0,1 %.

Otro objeto de la presente invención es un método para la preparación de las nanopartículas (NP) cargadas con los RSV y CL anteriores, en donde dicho método es un método de nanoprecipitación que comprende al menos las siguientes etapas:

- a) disolver en un recipiente, o en un reactor, provisto de agitación magnética o mecánica, de acuerdo con el tamaño del propio recipiente, la mezcla polimérica anterior de PCL:PLGA-PEG-COOH, RSV y CL en un disolvente orgánico adecuado, tal como acetonitrilo y/o acetona, preferiblemente acetonitrilo;
- b) añadir, con agitación suave, la solución resultante de la etapa a) sobre agua, a la que se ha añadido o no una cantidad eficaz de un tensioactivo, seleccionado del grupo que consiste en poloxámeros, Pluronic® F-127, polisorbatos, Tween® 80, alcohol polivinílico, PVA, preferiblemente, Pluronic® F-127 y PVA, más preferiblemente Pluronic® F-127, a una concentración de 0 % a 2,0 %, preferiblemente 0,1 % en peso con respecto al agua, para dar una suspensión coloidal lechosa de nanopartículas que encapsulan los principios activos;
- c) mantener dicha suspensión de la etapa b) en agitación durante aproximadamente 1 hora a una temperatura de 15 a 30 °C, preferiblemente a temperatura ambiente, para evaporar, eliminar, el disolvente orgánico;
- d) centrifugar las NP de la suspensión de la etapa c), a 10.000 rpm durante 5 minutos, y lavarlas con agua varias veces, por ejemplo, tres veces, para eliminar los compuestos activos no encapsulados (RSV y CL).

El método para la preparación de las NP de la presente invención, descrito antes, se ha llevado a cabo aplicando sustancialmente la misma metodología y las mismas condiciones de operación descritas para *trans*-resveratrol (RSV) en la publicación científica de Sanna V. *et al.*, Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. Mol. Pharm. 2013 Oct 7; 10(10):3871-81, que, por lo tanto, se incluye en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Las NP obtenidas como se ha descrito antes se caracterizaron en términos de morfología, tamaño de partícula, potencial zeta, eficiencia de encapsulación, análisis físico-químico y térmico, y estudios de liberación *in vitro*, aplicando las mismas metodologías y condiciones de operación descritos en Sanna V., *et al.*, Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. Mol. Pharm. 2013 Oct 7; 10(10):3871-81, que, por lo tanto, se incluye en la presente memoria como referencia en su totalidad.

En particular, se ha encontrado, como se señaló previamente, que las nanopartículas de la invención son de forma esférica, caracterizadas por un diámetro hidrodinámico medio en el intervalo de 50 nm a 350 nm; más preferiblemente, de 150 nm a 250 nm; aún más preferiblemente, de 180 nm a 200 nm.

Además, el rendimiento de producción del método fue alto, alrededor de 68-77 %, mientras que la eficiencia de encapsulación de los principios activos fue aún más alta, alrededor de 78-98 %.

Además, las NP de la presente invención han demostrado ser capaces de controlar la liberación *in vitro* de los principios activos encapsulados (RSV y CL). En efecto, a pH 7,4 (en condiciones fisiológicas), RSV y CL presentaron velocidades de liberación muy diferentes; mientras que el RSV fue liberado casi por completo después de las 4 primeras horas del ensayo, el CL se caracterizó por una liberación muy prolongada, con sólo aproximadamente el 12 % liberado en las 6 primeras horas, aproximadamente el 50 % después de 24 horas y el 75 % aproximadamente después de 48 horas

Finalmente, se realizaron estudios de citotoxicidad *in vitro* para evaluar si la administración conjunta de RSV y CL encapsulados podría haber permitido un aumento en la eficacia antiproliferativa en comparación con las moléculas individuales, tanto como tales como formuladas en nanosistemas, en líneas de células de cáncer de próstata (PCa) dependiente de andrógenos (células C-42) e independiente de andrógenos (células DU-145 y PC-3).

La eficacia antiproliferativa de las NP de la presente invención se evaluó utilizando el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) aplicando el procedimiento descrito en Sanna V., *et al.*, Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. Mol. Pharm. 2013 Oct 7; 10(10):3871-81, que, por lo tanto, se incluye en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Como se muestra en la Figura 1, las líneas de células de cáncer de próstata ensayadas (en este orden, células C-42, DU-145 y PC-3) se trataron durante 72 horas, respectivamente, sólo con RSV; sólo con CL; con RSV + CL en combinación; con NP no cargadas con activos, con NP cargadas sólo con RSV, con NP cargadas sólo con CL y con NP cargadas con RSV + CL en combinación. Cada experimento se repitió 3 o 5 veces (n = 3 o 5).

Como se puede ver en el gráfico, en todas las líneas de células de cáncer, el tratamiento con RSV y CL solos no encapsulados produce una reducción de la viabilidad que generalmente es dependiente de la dosis (Figura 1: a, c, e); el tratamiento con la combinación de RSV + CL no encapsulados produce un aumento de la citotoxicidad, en comparación con el tratamiento con RSV o CL solos, debido a un efecto aditivo, como se puede ver en los valores de combinación (CI) (Figura 2: a, b, c), que resultó, en general, entre 0,9 y 1,10 (calculado según el llamado método de "aditividad de Loewe").

La encapsulación de RSV o CL en NP (Figuras b, d, f) generalmente lleva a un aumento de la citotoxicidad en comparación con los perfiles observados para las moléculas libres.

También, las NP cargadas con la combinación de RSV + CL muestran todas una actividad antiproliferativa que es significativamente más alta que ambas, la combinación no encapsulada y las moléculas individuales encapsuladas. En este caso, este aumento de la citotoxicidad es debido a un efecto sinérgico, como se muestra por los valores de CI (Figura 2: d, e, f), que están entre 0,5 y 0,9, registrados para las tres líneas de células.

La comparación de los datos de viabilidad celular después del tratamiento con la combinación RSV + CL no encapsulada y, respectivamente, encapsulada en las NP, muestra un aumento de la citotoxicidad que también alcanza aproximadamente un 60 %.

Específicamente, en las líneas de células C-42 de cáncer de próstata dependiente de andrógenos, las NP cargadas con la combinación RSV + CL, en las tres dosis de combinación ensayadas, muestran una citotoxicidad de aproximadamente 30 %, 40 % y 45 % respectivamente más alta que en las correspondientes dosis de la combinación RSV + CL no encapsulada. A su vez, en las líneas de células de cáncer de próstata independiente de andrógenos, la actividad antiproliferativa de las NP cargadas con la combinación RSV + CL se mejora/aumenta en una media de aproximadamente un 40 % en las células DU-145, y con valores entre 45 % y 60 % en las células PC-3, en comparación con la combinación RSV + CL no encapsulada.

Esto muestra claramente que la administración conjunta de RSV + CL encapsulados en las nanopartículas de la presente invención provoca una mejora significativa e inesperada de los efectos anti-cáncer, en comparación con los

de las moléculas individuales (encapsuladas o no) y de su combinación no encapsulada, atribuible a un efecto sinérgico.

Sección experimental

5 La siguiente sección experimental describe algunos de los aspectos característicos de la presente invención, sin limitar sin embargo el amplio potencial de uso de la misma.

Materiales y métodos

10 Para la preparación de las nanopartículas de la presente invención, los materiales necesarios se encontraron sustancialmente en el comercio, de manera similar a lo que se indica en Sanna V., *et al.*, Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. *Mol. Pharm.* 2013 Oct 7; 10(10):3871-81; y en Sanna V. *et al.*, Nanoencapsulation of natural triterpenoid celastrol for prostate cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine.* 2015 Oct. 30;10:6835-6846, que se incorporan a la presente memoria como referencia.

El copolímero conjugado PLGA-PEG-COOH se preparó, en cambio, como se indica en el siguiente Ejemplo 1.

Ejemplo 1: Preparación del conjugado PLGA-PEG-COOH

15 A una solución de PLGA-COOH (3,0 g, 0,166 mmol: relación láctido/glicólido 50:50, -COOH terminal, viscosidad 0,20 dL/g) [Purac Biomaterials, Gorinchem, NL] en cloruro de metileno (10 mL), se añadieron N-hidroxiisuccinimida (NHS, 76 mg, 0,66 mmol) (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC, 140 mg, 0,72 mmol) [Sigma-Aldrich], y la mezcla de reacción se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 12 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. El PLGA-NHS se obtuvo por precipitación con éter dietílico frío (10 mL) como un
20 sólido blanco, que se filtró y se lavó repetidamente con una mezcla fría de éter dietílico y metanol (en una relación 1:1 en volumen, v:v), y después se secó al vacío y en una corriente de nitrógeno (rendimiento, aproximadamente 95 %). El polímero activado PLGA-NHS (3,0 g, 0,166 mmol) se disolvió en cloroformo anhidro (10 mL) se añadieron entonces los compuestos de NH₂-PEG-COOH (0,75 g, 0,22 mmol: MW = 3.400) [JenChem Technology, USA] y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 42 mg, 0,75 mmol) [Sigma-Aldrich] con agitación magnética. La mezcla de reacción se
25 mantuvo con agitación magnética durante 24 horas. El copolímero conjugado se obtuvo tratando la mezcla con éter dietílico previamente enfriado (rendimiento, aproximadamente 90 %). El PLGA-PEG-COOH resultante se secó al vacío, se caracterizó por ¹H NMR (500 MHz: Bruker Avance 500) y se usó para la preparación de las nanopartículas sin tratamiento adicional.

30 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,23 (m, -OC-CH(CH₃)O-, PLGA), 4,78 (m, -OC-CH₂O-, PLGA), 3,65 (s, -CH₂CH₂O-, PEG), 1,56 (brs, -OCCHCH₃O-, PLGA)

Ejemplo 2: Preparación de las nanopartículas de la invención

Se disolvieron en acetonitrilo (6 mL) PCL [Sigma-Aldrich] (56,4 mg) y PLGA-PEG-COOH [del Ejemplo 1] (37,6 mg), en una relación en masa de 1,5:1, RSV [Sigma-Aldrich] (6 mg) y CL [Baoji Guokang Bio-Technology Co., Ltd, República de China] (0,12 mg) y, con agitación suave, se añadieron gota a gota a agua (20 mL) que contenía Pluronic® F-127 [Sigma-Aldrich] (0,1 % p/p) para dar una suspensión coloidal lechosa que contiene las nanopartículas de la invención.
35 Dicha suspensión se hizo evaporar con agitación a temperatura ambiente para eliminar el disolvente orgánico; a continuación, se centrifugaron las nanopartículas a 10.000 rpm durante 5 min. y se lavaron con agua (al menos 3 veces) para eliminar los activos no encapsulados. Las nanopartículas cargadas con los activos se utilizaron inmediatamente para ensayos posteriores, o se liofilizaron y se almacenaron a -50 °C.

40 Las nanopartículas sin activos y las nanopartículas cargadas con los activos individuales, para ser utilizadas en comparación, se prepararon de la misma manera.

El rendimiento de la reacción de preparación de partículas fue de aproximadamente 74 %, mientras que la eficiencia de encapsulación de los principios activos fue de aproximadamente 92 %.

Ventajas/aplicabilidad industrial de la invención

45 Aunque, como se ha indicado antes, el uso farmacológico potencial de RSV y CL, a pesar de sus interesantes actividades antiproliferativas/citotóxicas, está fuertemente limitado debido a su baja biodisponibilidad, la coencapsulación de dichas moléculas en las nanopartículas de la invención, descrita antes y en las reivindicaciones adjuntas ha proporcionado la ventaja de aumentar su solubilidad y estabilidad química, reduciendo su toxicidad sistémica potencial, controlando su liberación y mejorando su biodisponibilidad global. Además, las nanopartículas
50 poliméricas anteriores cargadas con los principios activos naturales RSV y CL han demostrado ser muy eficaces/activas frente a las líneas cancerosas del cáncer de próstata, por lo que son inesperada y ventajosamente prometedoras para uso en el tratamiento de dicha patología.

Un objeto adicional de la presente invención es por tanto, el uso de las nanopartículas poliméricas anteriores cargadas con los activos RSV y CL para la administración y liberación controlada de dichos activos en el sitio deseado del organismo de un paciente.

5 Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es el uso de las nanopartículas poliméricas anteriores cargadas con los activos RSV y CL para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de próstata.

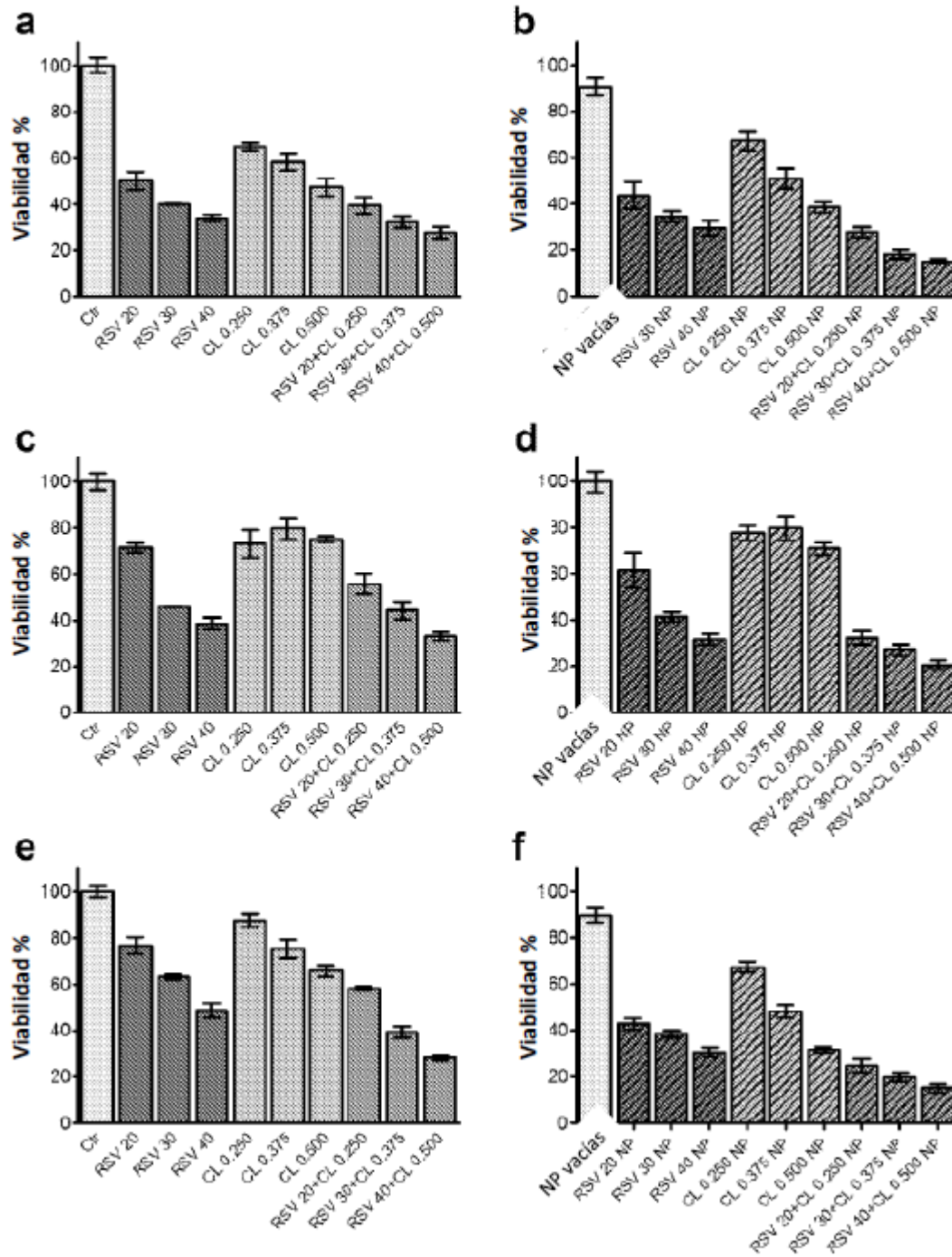
Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende las anteriores nanopartículas poliméricas cargadas con los activos RSV y CL para uso en el tratamiento del cáncer de próstata.

10

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas poliméricas biocompatibles (NP) para la liberación conjunta controlada de los principios activos naturales *trans*-resveratrol (RSV) y celastrol (CL), que comprenden al menos:
 - una mezcla polimérica biocompatible de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y copolímero conjugado poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-poli(etilenglicol) (PLGA-PEG-COOH); y
 - una cantidad eficaz de una mezcla de *trans*-resveratrol (RSV) y celastrol (CL).
2. Las nanopartículas poliméricas según la reivindicación 1, que además comprenden o no una cantidad eficaz de un tensioactivo.
3. Las nanopartículas poliméricas según la reivindicación 1 o 2, en donde en dicha mezcla polimérica los dos polímeros componentes están presentes en una relación de masa recíproca PCL: PLGA-PEG-COOH comprendida entre 3:0,5 a 0,5:1.
4. Las nanopartículas poliméricas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, en dicha mezcla de los dos principios activos,
 - RSV está presente a una concentración de 5 μ M a 50 μ M; y
 - CL está presente a una concentración de 0,050 μ M a 5,000 μ M.
5. Las nanopartículas poliméricas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en poloxámeros, Pluronic® F-127, polisorbatos, Tween® 80, alcohol polivinílico, PVA; estando presente dicho tensioactivo en solución acuosa a una concentración de 0 % a 2,0 % en peso, en relación con el disolvente acuoso.
6. Las nanopartículas poliméricas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizadas por una forma esférica y un diámetro hidrodinámico medio de 50 nm a 350 nm.
7. Un método para preparar las nanopartículas (NP) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho método es un método de nanoprecipitación que comprende al menos las siguientes etapas:
 - a) disolver en un recipiente provisto de agitación magnética o mecánica, dicha mezcla polimérica de PCL:PLGA-PEG-COOH, RSV y CL en un disolvente orgánico;
 - b) añadir, con agitación suave, la solución resultante de la etapa a) sobre agua, a la que se ha añadido o no una cantidad eficaz de un tensioactivo, para dar una suspensión coloidal lechosa de nanopartículas que encapsulan los principios activos;
 - c) mantener dicha suspensión de la etapa b) en agitación a una temperatura de 15 a 30 °C, para evaporar, eliminar, el disolvente orgánico;
 - d) centrifugar las nanopartículas poliméricas de la suspensión de la etapa c), y lavarlas con agua para eliminar los principios activos no encapsulados (RSV y CL).
8. Un método según la reivindicación 7, en donde
 - en dicha etapa a), dicho disolvente es acetonitrilo y/o acetona;
 - en dicha etapa b), dicho tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en poloxámeros, Pluronic® F-127, polisorbatos, Tween® 80, alcohol polivinílico, PVA; estando presente dicho tensioactivo en solución acuosa a una concentración de 0 % a 2,0 % en peso con respecto al disolvente acuoso;
 - en dicha etapa d), las nanopartículas poliméricas se centrifugan a 10.000 rpm durante 5 min; y
- en donde el rendimiento global del método es de aproximadamente 68-77 % y la encapsulación de los principios activos es de aproximadamente 78-98 %.
9. Uso de las nanopartículas poliméricas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el tratamiento *in vitro* de las líneas de células de cáncer de próstata C-42 y/o DU-145 y/o PC-3.
10. Una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas poliméricas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento del cáncer de próstata.

Figura 1



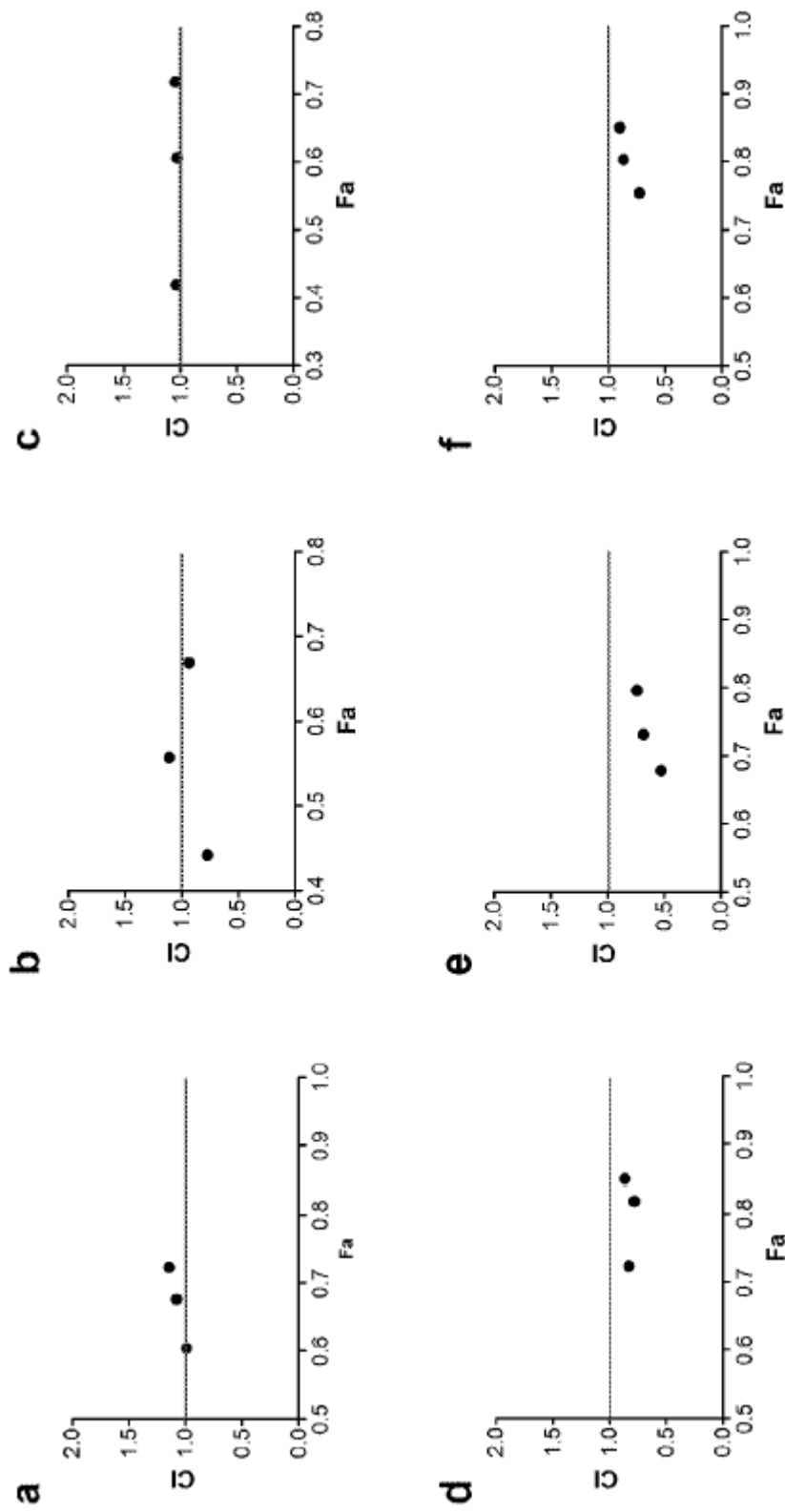


Figura 2