

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 027**

21 Número de solicitud: 202330580

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)
A61K 9/72 (2006.01)
A61K 47/46 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 31/438 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

11.07.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.01.2025

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.03.2025

Fecha de concesión:

30.07.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.08.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.00%)
Reitorado da Universidade de Santiago de
Compostela, Colexio de San Xerome, Pza. do
Obradoiro s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**CSABA, Noemi y
ROBLA ÁLVAREZ, Sandra**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **PARTÍCULAS DE POLEN COMO VEHÍCULOS PARA ADMINISTRACIÓN PULMONAR**

57 Resumen:

Partículas de polen como vehículos para administración pulmonar.

La presente invención se relaciona con micropartículas para liberación pulmonar, que comprenden una cápsula de polen purificada, que comprende una capa de intina y una capa de exina, y al menos un nanosistema encapsulado en dicha cápsula, en donde el nanosistema comprende un compuesto farmacéuticamente activo, en donde la capa de exina está recubierta con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención se relaciona igualmente con un método de obtención de dichas micropartículas y sus usos médicos, en particular para el tratamiento de la tuberculosis.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 994 027 B2

DESCRIPCIÓN

PARTÍCULAS DE POLEN COMO VEHICULOS PARA ADMINISTRACIÓN PULMONAR

Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de partículas de polen purificadas como
5 vehículos para liberación pulmonar.

Antecedentes de la invención

El tratamiento estándar para la tuberculosis (TB) causada por *Mycobacterium tuberculosis* incluye la terapia con antibióticos orales. La baja solubilidad y el alto metabolismo de los
10 fármacos en el tratamiento oral de la tuberculosis conduce al uso de terapias prolongadas que favorecen la aparición de resistencias, dificultando la adherencia del paciente. Además, la aparición de cepas de micobacterias resistentes a los medicamentos requiere más medicamentos y tratamientos de mayor duración. Alternativamente, la administración de fármacos por vía pulmonar ofrece acceso directo al epitelio pulmonar y los macrófagos
15 alveolares, evitando los efectos secundarios asociados con la administración oral. No obstante, varios factores, como las barreras físicas, los mecanismos de defensa pulmonar como los macrófagos, las enzimas alveolares y la eliminación mucociliar, constituyen un obstáculo en la liberación pulmonar de fármacos, por lo que actualmente no hay formulaciones antituberculosas inhalables disponibles para uso clínico.

La rifabutina, un fármaco de Clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), presenta una disolución deficiente y una absorción limitada. Este compuesto comparte similitudes estructurales y de actividad con la rifampicina, pero posee una mayor actividad antimicobacteriana y una amplia distribución tisular. Sin embargo, su gran volumen de distribución y su baja biodisponibilidad oral (menos del 20 % alcanza la circulación sistémica)
20 dan como resultado concentraciones plasmáticas bajas. La encapsulación de tales fármacos dentro de nanopartículas podría ser una solución eficaz, una vez que las nanopartículas de tamaños aproximadamente 200 nm se consideran adecuadas para administración pulmonar. Sin embargo, las nanopartículas sufren de baja inercia y se exhalan antes de llegar a las vías respiratorias. Este desafío podría superarse incorporando nanopartículas en partículas de
25 tamaño micrométrico, sirviendo como un sistema de entrega para facilitar su alcance a los macrófagos alveolares.

Las estrategias que utilizan la administración de micropartículas en forma de inhaladores de polvo seco (DPI, del inglés “dry powder inhalers”) han demostrado eficacia en la generación

de partículas inhalables para el tratamiento de la TB [Mehta, P.; Bothiraja, C.; Kadam, S.; Pawar, A. *Potential of Dry Powder Inhalers for Tuberculosis Therapy: Facts, Fidelity and Future. Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2018, 46, S791–S806, doi:10.1080/21691401.2018.1513938]. Estos enfoques emplean técnicas de ingeniería de partículas como el secado por aspersión y la liofilización para producir partículas inhalables adecuadas.

En este contexto, los granos de polen han surgido en los últimos años como candidatos viables para la encapsulación y administración de fármacos debido a su estructura de tamaño micrométrico.

Los granos de polen exhiben un tamaño uniforme, y comprenden esencialmente material genético contenido en un citoplasma (esporoplasma), el cual está recubierto por una primera capa interior denominada intina y una segunda capa denominada exina.

La exina de las partículas de polen presenta en su superficie una capa lipídica adicional, una compleja mezcla de proteínas, lípidos y otras moléculas (conocida como “pollenkitt”). La intina está generalmente formada por celulosa, mientras que la exina se compone de un material proteico denominado esporopolenina, y cuya composición exacta no se conoce. La exina es una capa extremadamente resistente, estable a condiciones ácidas y básicas, y presenta una porosidad elevada. Dada estas propiedades, se han ensayado diversas tecnologías que permitan aislar la exina, es decir, vaciar el interior de la exina de su intina y del material genético, así como limpiar la superficie exterior de la capa lipídica o pollenkitt.

Estas estructuras naturales se pueden procesar fácilmente para crear una plataforma de baja densidad con una gran cavidad interna, adecuada para la administración de fármacos mediante la encapsulación de fármacos tanto polares como no polares, proporcionándoles una protección. Además, el uso de esporopolenina ha demostrado una mejor capacidad de adhesión del fármaco y un aumento de la superficie de contacto entre el fármaco y la mucosa [Diego-Taboada, A.; Beckett, S.T.; Atkin, S.L.; Mackenzie, G. Hollow Pollen Shells to Enhance Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2014, 6, 80–96, doi:10.3390/pharmaceutics6010080].

Hasta la fecha, el potencial uso de partículas de polen para la administración pulmonar de fármacos sigue sin explorarse. Si bien el polen se deposita principalmente en la orofaringe, la exposición prolongada, particularmente a proteínas específicas, puede provocar sensibilización y el desarrollo de alergias y asma, tanto en el tracto respiratorio inferior como después de la ingestión en forma de alergias alimentarias. Los alérgenos se pueden eliminar mediante métodos de tratamiento químico, lo que da como resultado partículas de polen purificadas, libres de alérgenos, adecuadas para administración de fármacos.

WO2018146365 es una solicitud de patente enfocada en partículas de polen purificadas y su uso en la administración de ingredientes activos encapsulados. Describe una partícula de polen purificada que comprende una capa de intina, una capa de exina y un nanosistema, con la eliminación de la capa lipídica (pollenkitt). Este documento no describe el revestimiento de la superficie de la partícula de polen con un excipiente farmacéuticamente aceptable ni un sistema específico para la administración pulmonar.

WO2021183735 es una solicitud de patente centrada en cápsulas de polen sin proteínas para administrar compuestos activos a los pulmones. Menciona moléculas orgánicas de tamaño 50-2500 Da, incluidos antimicrobianos, y el uso de agentes de transfección como polímeros, lípidos y vesículas polipeptídicas. Se pueden combinar vehículos como liposomas o proteínas portadoras con los compuestos activos. Sin embargo, el documento carece de detalles sobre la composición de las partículas de polen y no especifica un excipiente farmacéuticamente aceptable que cubra la superficie de las partículas de polen.

WO2005000280 es una solicitud de patente que se centra en una sustancia activa unida a un soporte con un recubrimiento de esporas de exina, potencialmente esporopolenina. Describe una partícula de polen purificada que carece de una capa de intina. Describe una formulación para administración pulmonar en la que el compuesto activo se encapsula dentro de la cubierta de exina de la partícula de polen. Sin embargo, WO2005000280 no menciona la presencia de una capa de intina o el uso de nanosistemas para encapsular el compuesto activo.

En la solicitud WO2018146365A1 se describe la incorporación de nanosistemas en esporas huecas, pero no se menciona su utilización en administración pulmonar.

Así, hasta la fecha no existen formulaciones para administración pulmonar, en particular antituberculosas inhalables, disponibles para uso clínico.

Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado partículas de tamaño micrométrico de baja densidad para la deposición pulmonar profunda de fármacos. Las micropartículas están basadas en partículas de polen, que otorgan protección a un fármaco encapsulado, y que exhiben una distribución aerodinámica adecuada para su uso como sistema de liberación de fármacos en el pulmón.

Las micropartículas de la presente invención son un sistema de liberación de fármacos que podría considerarse de doble vehículo. El primer vehículo permite el transporte del fármaco

hasta las vías pulmonares y, una vez en el destino, el segundo vehículo permite la penetración celular. El primer vehículo son partículas de polen purificadas, es decir, polen sin la capa lipídica externa (pollenkitt) y sin el esporoplasma, y que comprenden una capa de exina e intina en donde la exina está preferiblemente funcionalizada con un excipiente pulmonar para que las partículas se distribuyan adecuadamente en las vías respiratorias pulmonares (excipiente que permita la disminución de su diámetro aerodinámico y aumento de la fracción de partículas finas, lo que les permite llegar a los alvéolos y una mejor distribución pulmonar). Las partículas de polen purificadas, denominadas en la presente divulgación como cápsulas, transportan lo que podría considerarse un segundo vehículo (un nanosistema), que comprende el fármaco. Este nanosistema permite que el fármaco atraviese la membrana celular.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula para liberación pulmonar que comprende:

- una cápsula de polen purificada, que comprende una capa de intina y una capa de exina; y
- al menos un nanosistema encapsulado en dicha cápsula, en donde el nanosistema comprende un compuesto farmacéuticamente activo;

en donde la capa de exina está recubierta con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un segundo aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para la preparación de la micropartícula del primer aspecto, caracterizado porque comprende:

- (a) una etapa de lavado, que comprende lavar una partícula de polen;
- (b) una etapa que comprende tratar la partícula de polen obtenida en la etapa anterior con un medio ácido para obtener cápsulas huecas de polen purificadas;
- (c) una etapa que comprende incubar las cápsulas huecas obtenidas en la etapa anterior, con un nanosistema que comprende un compuesto farmacéuticamente activo; y
- (d) una etapa que comprende recubrir las cápsulas resultantes con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula para liberación pulmonar, caracterizada porque se obtiene según el método del segundo aspecto.

Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una micropartícula según el primer o tercer aspecto, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula según el primer o tercer aspecto, o una composición farmacéutica según el cuarto aspecto, para su uso en medicina.

5 Un sexto aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula según el primer o tercer aspecto, o una composición farmacéutica según el cuarto aspecto, para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el pulmón.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Deposición aerodinámica in vitro de cápsulas de polen huecas y desgrasadas de *H. annuus* y *M. chamomilla* en el Impactador de Cascada de Andersen. Valores promedio $\pm$ Desv. Estándar, n = 3. Eje de ordenadas, porcentaje. Eje de abscisas, A: región extratorácica; B: región traqueobronquial; C: región pulmonar; 1: Inhalador; 2: Boca; 3: Tráquea; 4: etapa -1; 5: etapa 0; 6: etapa 1; 7: etapa 2; 8: etapa 3; 9: etapa 4; 10: etapa 5; 11: etapa 6; 12: filtro. Cada grupo contiene 4 columnas, la más a la izquierda representa cápsulas huecas de *M. chamomilla*, la segunda representa cápsulas desgrasadas de *M. chamomilla*; la tercera representa cápsulas huecas de *H. annuus* y la columna más a la derecha representa cápsulas desgrasadas de *H. annuus*.

Figura 2. Deposición aerodinámica in vitro en el Impactador de Cascada de Andersen de cápsulas de *M. chamomilla* recubiertas con manitol y/o leucina. Valores promedio $\pm$ Desv. Estándar, n = 3. Eje de ordenadas, porcentaje. Eje de abscisas, A: región extratorácica; B: región traqueobronquial; C: región pulmonar; 1: Inhalador; 2: Boca; 3: Tráquea; 4: etapa -1; 5: etapa 0; 6: etapa 1; 7: etapa 2; 8: etapa 3; 9: etapa 4; 10: etapa 5; 11: etapa 6; 12: filtro. Cada grupo contiene 4 columnas, la más a la izquierda representa cápsulas de *M. chamomilla* sin recubrir, la segunda representa cápsulas de *M. chamomilla* recubiertas con manitol; la tercera representa cápsulas de *M. chamomilla* recubiertas con leucina y la columna más a la derecha representa cápsulas de *M. chamomilla* recubiertas con manitol y leucina.

Figura 3. Deposición aerodinámica in vitro en el Impactador de Cascada de Andersen de cápsulas de *H. annuus* recubiertas con manitol y/o leucina. Valores promedio $\pm$ Desv. Estándar, n = 3. Eje de ordenadas, porcentaje. Eje de abscisas, A: región extratorácica; B: región traqueobronquial; C: región pulmonar; 1: Inhalador; 2: Boca; 3: Tráquea; 4: etapa -1; 5: etapa 0; 6: etapa 1; 7: etapa 2; 8: etapa 3; 9: etapa 4; 10: etapa 5; 11: etapa 6; 12: filtro. Cada grupo contiene 4 columnas, la más a la izquierda representa cápsulas de *H. annuus* sin recubrir, la segunda representa cápsulas de *H. annuus* recubiertas con leucina; la tercera

representa cápsulas de *H. annuus* recubiertas con manitol y la columna más a la derecha representa cápsulas de *H. annuus* recubiertas con manitol y leucina.

Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de cápsulas huecas de *M. chamomilla* (A, B), después de recubrimiento superficial por liofilización con manitol (C, D), leucina (E, F) y su combinación (G, H) a x2.0K (A, C, E, G) y a x3.5K (B, D, F, H).

Figura 5. Deposición aerodinámica *in vitro* de cápsulas según la invención y de cápsulas sin recubrimiento en el Impactador de Cascada de Andersen. Valores promedio $\pm$ Desv. Estándar, $n = 3$. Eje de ordenadas, porcentaje. Eje de ordenadas de gráfica en el recuadro, porcentaje de rifabutina. Eje de abscisas, A: región extratorácica; B: región traqueobronquial; C: región pulmonar; 1: Inhalador; 2: Boca; 3: Tráquea; 4: etapa -1; 5: etapa 0; 6: etapa 1; 7: etapa 2; 8: etapa 3; 9: etapa 4; 10: etapa 5; 11: etapa 6; 12: filtro. Cada grupo contiene 2 columnas, la más a la izquierda representa cápsulas de *M. chamomilla*, con nanosistemas de protamina con 5% (p/p) de rifabutina, sin recubrir, mientras que la columna más a la derecha representa cápsulas de *M. chamomilla*, con nanosistemas de protamina con 5% (p/p) de rifabutina, recubiertas con una combinación de manitol y leucina.

Figura 6. (A) FTIR y (B) espectros de difracción de rayos X (XRPD) de: 1, rifabutina; 2, partículas de polen purificadas con rifabutina; 3, partículas de polen purificadas con nanosistemas de protamina que comprenden rifabutina; 4, partículas de polen purificadas con nanosistemas sin rifabutina; y 5, partículas de polen purificadas de *M. chamomilla*. En la Figura A: Eje de ordenadas, absorbancia; Eje de abscisas, número de onda (en cm^{-1}). En la Figura B: Eje de ordenadas, intensidad relativa (%); Eje de abscisas, 2θ (en grados).

Figura 7. Termogramas DSC de partículas de polen de *M. chamomilla* huecas y cargadas con nanosistemas, sin recubrimiento y con recubrimiento superficial con manitol (MAN)/leucina (LEU). Eje de ordenadas, flujo de calor. Curva A: Rifabutina; Curva B, partículas de polen de *M. chamomilla*; Curva C, partículas de *M. chamomilla* recubiertas con MAN/LEU; Curva D, partículas de *M. chamomilla* con nanosistemas de protamina que comprenden rifabutina; y Curva E, micropartículas de *M. chamomilla* con nanosistemas de protamina que comprenden rifabutina y recubiertas con MAN/LEU según la invención.

Figura 8. Resultados MTT de la línea celular de macrófagos Raw264.7 después del tratamiento con cápsulas la invención (cargadas con rifabutina al 5%) a diferentes concentraciones (100-1000 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. Los resultados se muestran como valores promedio $\pm$ Desv. estándar, $n = 3$. Eje de ordenadas, viabilidad expresada en porcentaje. Eje de abscisas, concentración expresada en mg/mL . Leyenda, 1: *M. chamomilla* con

nanosistema de protamina que comprende 5% de rifabutina (p/p); 2: nanosistema de protamina que comprende 5% rifabutina (p/p).

Figura 9. Disolución *in vitro* de: 1, rifabutina a partir de las micropartículas de la invención (5% rifabutina (p/p) en nanosistema de protamina encapsulado en cápsulas de *M. chamomilla* recubiertas con leucina y manitol); 2, rifabutina; y 3, rifabutina en nanosistemas no encapsulados. Los datos representan promedio $\pm$ Desv. estándar, n=3 mediciones independientes.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En el presente documento, el término "compuesto farmacéuticamente activo" es sinónimo de "agente farmacéuticamente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" e incluye no solo aquellas sustancias capaces de un efecto farmacéutico, sino también cualquier ácido, base, sal, o forma polimórfica de los mismos u otros derivados que sean capaces de un efecto farmacéutico cuando sean absorbidos por el cuerpo.

El término "tensioactivo" abarca cualquier derivado del mismo capaz de convertirse en tensioactivo tras la aplicación pulmonar.

Por un componente "farmacéuticamente aceptable" se entiende un componente que no es indeseable desde el punto de vista biológico o de otro tipo, por ejemplo, el componente puede incorporarse en una formulación farmacéutica de la invención y administrarse a un paciente como se describe aquí sin causar un efecto biológico indeseado o interaccionar de forma nociva con cualquiera de los demás componentes de la formulación en la que está contenido. Cuando el término "farmacéuticamente aceptable" se usa para referirse a un excipiente o vehículo, significa que dicho excipiente o vehículo cumple con los estándares requeridos de pruebas toxicológicas y de fabricación según la FDA y/o la farmacopea europea.

En el presente documento, "diámetro aerodinámico de la masa mediana" o "MMAD" (del inglés *Mass median aerodynamic diameter*), o simplemente "diámetro aerodinámico", tiene el significado común en el arte. Se refiere a la mediana del tamaño aerodinámico de una pluralidad de micropartículas, normalmente en una población polidispersa. El "diámetro aerodinámico" puede ser el diámetro de una esfera de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de sedimentación, generalmente en el aire, que un polvo y, por lo tanto, es una forma útil de caracterizar un polvo en aerosol u otra partícula dispersa o formulación de partículas en términos de su sedimentación. El diámetro aerodinámico abarca la forma, la densidad y el tamaño físico de la micropartícula. En el presente documento, MMAD se refiere

al diámetro aerodinámico de la mediana de la masa de la micropartícula, o la distribución del tamaño de partícula de micropartículas en aerosol, determinada por impacto en cascada. Los dispositivos de impactación en cascada incluyen una serie de etapas de tamaño de poro decreciente. Las etapas atrapan partículas dentro de un chorro en movimiento que pasa a través del impactador. La cantidad de material particulado (que tiene tamaños de partículas dentro de un rango de tamaño definido) que queda atrapada en cada etapa puede determinarse lavando la etapa y midiendo la cantidad de material eluido. Un ejemplo de impactador en cascada es el impactador en cascada de Andersen.

Micropartículas de la invención

- 10 Las micropartículas de la presente invención comprenden partículas de polen purificadas (que comprenden una capa de exina e intina) y un nanosistema que comprende el fármaco. En el contexto de la presente invención, las partículas de polen purificadas se denominan cápsulas. En la presente invención, las cápsulas comprenden en su superficie exterior un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 En una realización particular, las micropartículas exhiben un diámetro aerodinámico (MMAD) inferior a 15 μm , preferiblemente inferior a 10 μm , preferiblemente entre 1 y 10 μm , más preferiblemente entre 2 y 10 μm , aún más preferiblemente entre 3 y 9 μm . En una realización más preferida, las micropartículas exhiben un diámetro aerodinámico (MMAD) entre 5 y 10 μm , aún más preferiblemente entre 6 y 9 μm . El MMAD se determina por impacto en cascada, como se explica en este documento.

Cápsulas de polen

- Las micropartículas de la presente invención comprenden partículas de polen purificadas, que se denominan aquí como “cápsulas de polen” o simplemente “cápsulas”. Estas cápsulas son el resultado de purificar partículas de polen con disolventes orgánicos y ácidos, de manera a eliminar su interior (esporoplasma) y su capa más exterior (pollenkitt). El método de purificación está descrito en la sección de los ejemplos. Así, en esta divulgación las cápsulas de polen también se identifican como “cápsulas de polen purificadas”.

- Preferiblemente, el método de purificación vacía total- o parcialmente el esporoplasma. Así, en una realización particular, las cápsulas de polen comprenden menos del 90%, preferiblemente menos del 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, aún más preferiblemente menos del 10% en peso del citoplasma, con respecto al peso original del citoplasma. En una realización preferida, las cápsulas de polen no comprenden esporoplasma.

Las cápsulas de polen comprenden así una cubierta de doble capa, la interior siendo la intina y la exterior la exina. Además, dicha purificación puede no ser total, y todavía retener parcialmente la capa lipídica.

5 En una realización particular, las cápsulas de polen retienen menos del 50%, preferiblemente menos del 40%, preferiblemente menos del 20%, preferiblemente menos del 10%, aún más preferiblemente menos del 5% en peso de la capa lipídica, con respecto al peso original de la capa lipídica.

En una realización particular, la cápsula de polen está desprovista de su capa lipídica (pollenkitt). La ausencia de pollenkitt permite que la cubierta de las cápsulas sea porosa, lo
10 que posibilita la penetración de los nanosistemas hacia el interior de las cápsulas. Sin ánimo de ceñirse a una teoría en particular, se considera que el pollenkitt se encuentra rellenando los nanoporos de las cápsulas, presentes de manera natural en su estructura, así como sus aperturas, de mayor tamaño. Tanto los nanoporos como las aperturas de las cápsulas varían en número y tamaño, y pueden estar presentes o ausentes en función del tipo de polen
15 empleado. La eliminación del pollenkitt da lugar a la apertura de los nanoporos, lo que posibilita la encapsulación de determinados nanosistemas en función de su tamaño a nivel de la exina. Sin embargo, para la encapsulación interior de los nanosistemas es necesario llevar a cabo además de la eliminación del pollenkitt, la eliminación del esporoplasma.

Así, en otra realización particular, la cápsula de polen está desprovista de esporoplasma.

20 Excipientes farmacéuticamente aceptables

Las micropartículas de la invención comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la administración por vía pulmonar.

En el contexto de la presente invención, los excipientes farmacéuticamente aceptables, una vez recubriendo la micropartícula, deben mejorar su aerosolización y/o dispersión, comparado
25 con micropartículas sin el recubrimiento. Estos excipientes se utilizan en la presente invención para facilitar el flujo de las micropartículas dentro del tracto respiratorio, en particular para facilitar la vectorización de las micropartículas hacia las regiones traqueobronquial y pulmonar. Preferiblemente, los excipientes farmacéuticamente aceptables que recubren las micropartículas de la invención mejoran sus propiedades de flujo y el diámetro aerodinámico
30 de las micropartículas. Estas propiedades permiten que las micropartículas lleguen más fácilmente a las regiones de interés, como la región traqueobronquial y preferiblemente la región pulmonar, más preferiblemente los alveolos.

En particular, los materiales excipientes pueden funcionar normalmente para mejorar aún más la estabilidad física y química del agente activo, minimizar el contenido de humedad residual

e impedir la captación de humedad, y para mejorar el tamaño de las partículas, el grado de agregación, las propiedades de superficie de las partículas (es decir, la rugosidad), facilidad de inhalación y dirección de las partículas al pulmón.

5 En una realización particular, los excipientes farmacéuticamente aceptables constituyen la capa más externa de la micropartícula de la invención.

En una realización particular, el excipiente farmacéuticamente aceptable reduce al menos en 10% el diámetro aerodinámico de la masa mediana de la micropartícula, cuando se compara con una micropartícula idéntica pero sin excipiente farmacéuticamente aceptable, determinado con un Impactador de Cascada Andersen. Preferiblemente, el excipiente
10 farmacéuticamente aceptable reduce al menos en 20% el diámetro aerodinámico de la masa mediana de la micropartícula, cuando se compara con una micropartícula idéntica, pero sin excipiente farmacéuticamente aceptable, determinado con un Impactador de Cascada Andersen.

En una realización particular, los excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan
15 del grupo que consiste de aminoácidos, péptidos, proteínas, polímeros, polioles, carbohidratos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, fosfolípidos, y combinaciones de los mismos.

Ejemplos de aminoácidos incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina,
20 aspartamo, tirosina, triptófano, prolina y similares.

Ejemplos de péptidos incluyen dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros que comprenden uno o más componentes aminoácidos hidrófobos tales como los que se han descrito anteriormente.

Ejemplos de proteínas incluyen albúminas tales como albúmina de suero humano (HSA),
25 albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, hemoglobina y similares.

Ejemplos de polímeros incluyen polivinilpirrolidonas, celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, Ficolls (un azúcar polimérico), hidroxietilalmidón, dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutiléter- β -ciclodextrina, polietilenglicoles y pectina.

30 Ejemplos de carbohidratos son azúcares, azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y polímeros de azúcar. En particular, los carbohidratos adecuados para uso en la invención incluyen monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa,

trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol y similares.

5 Ejemplos preferidos de ácidos grasos y/o sales de ácidos grasos, son aquellos ácidos grasos endógenos al pulmón, preferiblemente el ácido esteárico y aún más preferiblemente el estearato de magnesio.

En una realización preferida, los excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste de manitol, leucina, trehalosa, lactosa, albumina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, los
10 excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste de manitol, leucina, y combinaciones de los mismos.

Estos excipientes recubren las micropartículas en cantidades comprendidas entre el 10% y el 95% en peso, preferiblemente entre el 20% y el 80% y más preferiblemente entre el 30% y el 70% en peso, con respecto al peso de la micropartícula de la invención sin el recubrimiento.
15 En una realización aún más preferida, los excipientes se presentan como recubrimiento de las micropartículas en cantidades comprendidas entre el 40% y el 60% en peso, con respecto al peso de la micropartícula de la invención sin el recubrimiento.

En una realización particular, los excipientes están adheridos a la superficie de las micropartículas. Preferiblemente, la adhesión es entre los excipientes y la capa de exina de la
20 cápsula de polen.

En una realización preferida, los excipientes están adheridos a la superficie de las micropartículas mediante fuerzas de Van der Waals, preferiblemente a la capa de exina.

Nanosistemas

Los nanosistemas de la presente invención comprenden un compuesto farmacéuticamente
25 activo, y están encapsulados en la cápsula de polen. Los nanosistemas deben ser estables en tejidos y fluidos biológicos, en particular relacionados con el tracto respiratorio, en particular el pulmón.

En una realización particular, los nanosistemas comprenden polisacáridos, poliaminoácidos o polipéptidos, por ejemplo quitosano, poliarginina y/o protamina.

30 En una realización preferida, los poliaminoácidos se seleccionan del grupo que consiste de ácido poliaspártico, poliglutámico o polilisina.

En otra realización preferida, los polipéptidos se seleccionan del grupo que consiste de péptidos de penetración celular (CPPs, por sus siglas en inglés), oligopéptidos, protamina de

bajo peso molecular (LMWP). Preferiblemente los oligopéptidos son ricos en arginina, como octargininas.

En otra realización preferida, los polisacáridos se seleccionan del grupo que consiste de quitosano, glicoproteínas como el ácido polisialico o polímeros sintéticos como ácido láctico-co-glicólico (PLGA) o poliláctico (PLA).

La protamina es de especial interés en la presente invención por su capacidad para interactuar con las células e internalizar fármacos. Sin ánimo de ceñirse a una teoría en particular, los inventores consideran que el uso ventajoso de protamina se debe a la secuencia repetitiva de arginina presente en su estructura, lo que le proporciona una actividad de translocación eficiente a través de las membranas biológicas, incluidas las células alveolares. Así, en una realización preferida, los nanosistemas de las micropartículas de la invención comprenden protamina y un compuesto farmacéuticamente activo. Además, y sin ánimo de ceñirse a una teoría en particular, los inventores consideran que la protamina forma una capa proteica que encapsula el compuesto farmacéuticamente activo.

En una realización particular, el nanosistema comprende además un componente aceitoso. En el contexto de la presente invención, el término “aceitoso” ha de entenderse como sinónimo de “oleoso”. Preferiblemente, el nanosistema comprende una capa de protamina que encapsula el compuesto farmacéuticamente activo y un componente aceitoso. El componente aceitoso puede ser un monoglicérido, diglicérido y/o triglicérido, de cadena larga o media. En una realización particular, el componente aceitoso se selecciona del grupo que consiste de aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de geranio, aceite de palma, alfa-tocoferol (vitamina E), ácido oleico, ácido linoleico, miristato de isopropilo, escualeno, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol®, Maisine®, triglicérido caprílico/cáprico, linoleoil macrogol-6 glicéridos (ésteres PEG-6 de aceite de maíz), oleato de glicerilo, linoleato de glicerilo, monooleato de glicerol y combinaciones de los mismos. El Miglyol® es el nombre comercial de un producto que contiene una mezcla de glicéridos de decanoilo y octanoilo (ácido cáprico/caprílico). Labrafil® es la marca de un producto comercial que contiene oleoil macrogol-6 glicéridos. Labrafac® es la marca de un producto comercial que contiene triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, conocido como triglicérido caprílico/cáprico (HLB 1). Peceol® es la marca de un producto comercial que contiene monooleatos de glicerol (tipo 40). Maisine® es la marca de un producto comercial que contiene monolinoleato de glicerol. En una realización preferida, el compuesto aceitoso se selecciona del grupo que consiste de aceite de escualeno, aceites aromatizantes, aceite de silicona, aceites esenciales, vitaminas insolubles en agua, estearato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de octilo, palmitato de cetilo, behenato de tridecilo,

adipato de diisopropilo, dioctilo sebacato, antranilato de mentilo, octanoato de cetilo, salicilato de octilo, miristato de isopropilo, cetoles de dicaprato de glicol de neopentilo, Cerafilos®, oleato de decilo, lactatos de alquilo C₁₂-C₁₅, lactato de cetilo, lactato de laurilo, neopentanoato de isoestearilo, lactato de miristilo, estearato de isocetilo estearoilo, estearato de octildodecil

5 estearoilo, aceites de hidrocarburo, isoparafina, parafinas líquidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de colza, aceite de chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, palma fraccionada aceite, aceite de maní, aceite de ricino, aceite de semilla de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de salvado

10 de arroz, aceite de cártamo, aceite de té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de macadamia, aceite de germen de trigo, aceite de almendras , aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de girasol, aceite de cáñamo, aceite de nuez de kukui, aceite de aguacate, aceite de nuez, aceite de pescado, aceite de bayas, aceite de pimienta jamaicana, aceite de enebro, aceite de semilla, aceite de semilla de almendra,

15 aceite de anís, aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez moscada, aceite de hoja de albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela, aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón, aceite de árbol de té, aceite de orégano, aceite de hoja de pachulí, aceite de hoja de menta, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de menta verde, aceite de hoja de árbol de té,

20 aceite de hoja de tomillo, aceite de hoja de té de Canadá, aceite de flor, aceite de manzanilla, aceite de salvia romana, aceite de clavo, aceite de flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de flor de jazmín, aceite de flor de lavanda, aceite de flor de mauka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja, aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza de casia, aceite de corteza de canela, aceite de corteza de

25 sasafrás, aceite de madera, madera de alcanfor aceite, aceite de madera de cedro, aceite de tallo de rosa, aceite de sándalo, aceite de madera de jengibre, aceite de resina, aceite de ricino, aceite de mirra, aceite de cáscara, aceite de cáscara de Bérnago, aceite de cáscara de pomelo, aceite de cáscara de limón, aceite de cáscara de lima, aceite de cáscara de naranja, mandarina aceite de cáscara, aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido

30 linoleico, alcohol oleico, alcohol isoestearílico, oleato de etilo, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Rylo®, Peceol® y Maisine®, derivados sintéticos o semisintéticos de los mismos y combinaciones de los mismos . En una realización más preferida, el componente aceitoso se selecciona del grupo que consiste en aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de palma, otocoferol

35 (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac® , Peceol® y

Maisine® o mezclas de los mismos. Más preferiblemente, los aceites son Miglyol®, escualeno o a-tocoferol.

En una realización preferida, el componente aceitoso se selecciona del grupo que consiste en ácido oleico, triglicérido caprílico/cáprico (como el Miglyol®812), escualeno, alfa-tocoferol y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular, el nanosistema comprende además un surfactante. Preferiblemente, surfactantes compatibles con el tejido pulmonar. En una realización particular, el surfactante se caracteriza por una relación hidrofílica-lipofílica (balance hidrófilico-lipofílico (HLB)) superior a 3, preferiblemente superior a 8. En una realización

preferida, el surfactante se selecciona del grupo que consiste de monooleato de sorbitán polioxietilenado (polisorbato 80; Tween 80® ; HLB 15), monolaurato de sorbitán polioxietilenado (polisorbato 20; Tween 20® ; HLB 16.7), monoestearato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 60, HLB 14.9 y Tween 61® ; HLB 9.6), polioxietileno monooleato de sorbitán (Tween 81® ; HLB 10), triestearato de sorbitán polioxietilenado (Tween 65® ; HLB 10.5), trioleato de sorbitán polioxietilenado (Tween 85® ; HLB 11), monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 20, HLB 16.7 y Tween 21® HLB 13,3); Ésteres de ácidos grasos PEGilados y mezclas con PEG, monoestearato de polietilenglicol (HLB 11.6), estearato de polietilenglicol, estearato de polietilenglicol 40 (HLB 17), dilaurato de polietilenglicol 400 (HLB 9.7), monopalmitato de polietilenglicol (HLB 11,6), estearato de polietilenglicol, estearato de polietilenglicol 40 (HLB 16,9) estearato de polietilenglicol 100 (HLB 18,8), Solutol HS15® (HLB 15), 15-hidroxiestearato de polietilenglicol (HLB 14-16), succinato de polietilenglicol D-alfa-tocoferilo (TPGS; HLB 13.2), oleato de trietanolamonio (HLB 12), oleato de sodio (HLB 18), colato de sodio (HLB 18), desoxicolato de sodio (HLB 16), lauril sulfato de sodio (HLB 40), glicocolato de sodio (HLB 16-18), oleato de trietanolamina (HLB 12), goma tragacanto (HLB 11.9) y dodecilsulfato de sodio (HLB 40); Poloxámero 124 (HLB 16), Poloxámero 188 (HLB 29), Poloxámero 237 (HLB 29), Poloxámero 238 (HLB 28), Poloxámero 278 (HLB 28), Poloxámero 338 (HLB 27) y Poloxámero 407 (HLB 22), monooleato de sorbitán (Span® 80, HLB 4.3), monolaurato de sorbitán (Span® 20, HLB 8.6), monoestearato de sorbitán (Span® 60, HLB 4.7), trioleato de sorbitán (Span® 85, HLB 1.8), sesquiolato de sorbitán (Span® 83, HLB 3.7), monopalmitato de sorbitán (Span® 40, HLB 6.7), isoestearato de sorbitán (Span® 120, HLB 4.7), monopalmitato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 40, HLB 15.6) y combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, el nanosistema comprende un surfactante seleccionado del grupo que consiste de Solutol® HS 15, Tween® 20, Tween® 80, Span® 80, Labrasol®,

Poloxamer 188, glicocolato sódico y combinaciones de los mismos. En una realización aún más preferida, el surfactante no es un fosfolípido.

En otra realización particular, el nanosistema comprende además un agente de estabilización, preferiblemente en la superficie externa del nanosistema. La presencia opcional de un agente de estabilización sirve para evitar la agregación de los nanosistemas. En una realización preferida, el agente de estabilización se selecciona del grupo que consiste en lecitina, alcohol polivinílico, Kolliphor®, estearato de polietilenglicol (PEGst) y mezclas de los mismos. Ejemplos de Kolliphor® son el Kolliphor PS 20, Kolliphor PS 60 o Kolliphor PS 80 (Números CAS 9005-64-5, 9005-67-8 y 9005-65-6, respectivamente), Kolliphor EL (Número de CAS 61791-12-6), Kolliphor SLS (Número de CAS 151-21-3), o el Kolliphor P188 (Número de CAS 9003-11-6).

Así, en una realización particular, el nanosistema comprende una capa externa que comprende el compuesto farmacéuticamente activo, opcionalmente un componente aceitoso, y está opcionalmente recubierto con un agente de estabilización.

En una realización preferida, el nanosistema comprende una capa externa de protamina que comprende una emulsión con al menos un compuesto farmacéuticamente activo y un componente aceitoso, opcionalmente Miglyol®812, y está recubierto con un agente de estabilización, preferiblemente estearato de polietilenglicol.

En una realización particular, los nanosistemas de las micropartículas de invención exhiben un diámetro hidrodinámico comprendido entre 100 y 500 nm, preferiblemente entre 100 y 300 nm, más preferiblemente entre 150 y 250 nm, medido mediante dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*).

En una realización particular, los nanosistemas de las micropartículas de invención exhiben carga superficial positiva, negativa o neutra. En otra realización particular, los nanosistemas de las micropartículas de invención exhiben carga superficial positiva. En otra realización particular, los nanosistemas de las micropartículas de invención exhiben carga superficial negativa. En otra realización particular, los nanosistemas de las micropartículas de invención exhiben carga superficial neutra.

30 Compuesto farmacéuticamente activo

Las micropartículas de la presente invención comprenden un compuesto farmacéuticamente activo comprendido en un nanosistema, que a su vez está comprendido en cápsulas de polen para administración pulmonar. En comparación con la vía oral, la vía pulmonar permite una

acción rápida y una mayor biodisponibilidad debido a la gran superficie y alta vascularización de los alvéolos (70-140 m²). En la presente invención, el compuesto farmacéuticamente activo debe ser apto para administración pulmonar.

En una realización particular, el compuesto farmacéuticamente activo es un antibiótico, preferiblemente para el tratamiento de tuberculosis. Preferiblemente, el compuesto se selecciona de isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida, kanamicina, moxifloxacina, levofloxacina, o rifabutina. La rifabutina es un derivado de la rifamicina, y es un antibiótico principalmente bactericida usado para tratar la tuberculosis.

En una realización preferida, el compuesto farmacéuticamente activo es rifabutina.

En una realización particular, el compuesto farmacéuticamente activo se encuentra en una concentración comprendida entre el 0.5% y el 20% en peso, con respecto al peso del nanosistema. Preferiblemente, el compuesto farmacéuticamente activo se encuentra en una concentración comprendida entre el 0.5% y el 10% en peso, más preferiblemente entre el 0.5% y el 5% en peso, aún más preferiblemente entre el 0.5% y el 5% en peso, con respecto al peso del nanosistema. En este contexto, una concentración de, por ejemplo, el 2% en peso con respecto al peso del nanosistema significa que hay 2 mg de compuesto activo por cada 100 mg de nanosistema.

En una realización particular, el compuesto farmacéuticamente activo se encuentra en una concentración comprendida entre el 0.5% y el 20% en peso, con respecto al peso total de las cápsulas. Preferiblemente, el compuesto farmacéuticamente activo se encuentra en una concentración comprendida entre el 0.5% y el 10% en peso, más preferiblemente entre el 0.5% y el 5% en peso, aún más preferiblemente entre el 0.5% y el 5% en peso, con respecto al peso total de las cápsulas. En este contexto, una concentración de, por ejemplo, el 2% en peso con respecto al peso del nanosistema significa que hay 2 mg de compuesto activo por cada 100 mg de cápsulas.

Procedimiento de obtención

El procedimiento de la invención, según el segundo aspecto, es un procedimiento para la preparación de la micropartícula del primer aspecto, es decir, de la micropartícula de la invención. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) una etapa de lavado, que comprende lavar una partícula de polen;
- (b) una etapa que comprende tratar la partícula de polen obtenida en la etapa anterior con un medio ácido para obtener cápsulas huecas de polen purificadas;
- (c) una etapa que comprende incubar las cápsulas huecas obtenidas en la etapa anterior, con un nanosistema que comprende un compuesto farmacéuticamente activo; y

- (d) una etapa que comprende recubrir las cápsulas resultantes con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La etapa (a), de lavado, permite la eliminación del pollenkitt, en donde el pollenkitt es la capa lipídica que recubre las partículas de polen. En una realización particular, el lavado permite la
 5 eliminación parcial del pollenkitt, preferiblemente la eliminación total del pollenkitt. La etapa (a) comprende el lavado de la partícula de polen en un medio acuoso, en un medio orgánico, en un medio acuoso seguido de un medio orgánico o en un medio orgánico seguido de un medio acuoso.

En una realización particular, la etapa (a) comprende el paso de lavar las partículas de polen
 10 con agua a una temperatura de entre 20 °C y 60 °C, preferiblemente entre 20 °C y 50 °C, más preferiblemente entre 20 °C y 45 °C, aún más preferiblemente entre 20 °C y 40 °C. Este paso comprende preferiblemente la suspensión de las partículas en el agua, y puede llevarse a cabo bajo agitación, preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 1 y 60 minutos, preferiblemente entre 1 y 20 minutos, más preferiblemente entre 1 y 10 minutos y aún más
 15 preferiblemente entre 2 y 10 minutos. En una realización particular, la etapa (a) comprende el paso adicional de recuperar las partículas lavadas, preferiblemente mediante filtración. Estos pasos anteriores pueden repetirse si fuera necesario, por ejemplo, sometiendo varias veces las partículas a un lavado con agua bajo agitación y recuperación mediante filtrado. Por último, la etapa (a) puede incluir un último paso de secado de las partículas lavadas.

En una realización particular, la etapa (a) comprende el paso de lavar las partículas con un
 20 disolvente orgánico, seleccionado del grupo que consiste en hidrocarburos cíclicos o lineales como, por ejemplo, de fórmula C_nH_{n+2} (no-cíclico, lineal o ramificado) o C_nH_{2n} (cíclico), de 5 a 20 átomos de carbono ($n=5-20$). Ejemplos que pueden ser utilizados en la presente invención son el pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, ciclopentano, o ciclohexano, o
 25 mezclas de los mismos, preferiblemente, el ciclohexano. El disolvente orgánico también puede ser un alcohol, por ejemplo, de 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo, de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos son el metanol, el etanol, el propanol, el butanol, o mezclas de los mismos. También son ejemplos no limitantes los hidrocarburos halogenados, es decir, hidrocarburos como los definidos al principio de este párrafo, pero en los que al menos uno de los átomos
 30 de hidrógeno se ha sustituido por un halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente cloro). El hidrocarburo halogenado utilizado en la presente invención puede tener la fórmula $C_nH_{2n+2-z}X_z$ (no-cíclico, lineal o ramificado) o $C_nH_{2n-z}X_z$ (cíclico) en donde z es un número entero (igual o inferior a $2n+2$ o a $2n$, según sea el caso) y X es flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente cloro. Ejemplos de este tipo de disolventes son el diclorometano y el
 35 cloroformo. También es posible realizar el lavado utilizando mezclas de disolventes orgánicos

en diferentes proporciones. Por ejemplo, utilizando una mezcla de hidrocarburo halogenado:alcohol en proporciones comprendidas entre 1:20 y 20:1. Un ejemplo puede ser la mezcla de cloroformo y metanol. Otros disolventes orgánicos que se pueden utilizar en la presente invención son aquellos que incluyen un grupo carbonilo o éster, y que tienen un bajo peso molecular, por ejemplo, por debajo de 250 Da. Ejemplos extendidos de estos disolventes son la acetona o el acetato de etilo. Así, en una realización preferida, la etapa (a) comprende un lavado con disolvente orgánico seleccionado de acetona, ciclohexano, cloroformo, diclorometano, metanol, y mezclas de los mismos. Al igual que en el caso del lavado con agua, se puede realizar más de un lavado con disolventes orgánicos. Se prefiere también que el lavado con disolvente orgánico se haga a temperaturas bajas o moderadas, por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 15°C y 60°C, preferiblemente, entre 20°C y 45°C. El lavado con disolvente orgánico comprende preferiblemente una homogenización de la suspensión durante un tiempo comprendido entre 1 y 60 minutos, preferiblemente entre 1 y 20 minutos, más preferiblemente entre 1 y 10 minutos y aún más preferiblemente entre 2 y 10 minutos. En una realización preferida, las partículas en suspensión en medio orgánico son filtradas a vacío y secadas, opcionalmente a una temperatura comprendida entre 25 °C y 80 °C, por ejemplo, a 60 °C. Estos pasos de la etapa (a) pueden repetirse, por ejemplo, con disolventes orgánicos diferentes.

La etapa (b), de tratamiento ácido, permite vaciar parcial o totalmente la partícula de polen de su citoplasma, el esporoplasma. En una realización particular, el tratamiento ácido permite la eliminación parcial del citoplasma. Preferiblemente, permite la eliminación total del citoplasma. En una realización particular, la etapa (b) comprende tratamiento con ácido fosfórico. En otra realización particular, la etapa (b) comprende tratamiento con ácido durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 14 horas, preferiblemente entre 1 y 10 horas, más preferiblemente entre 1 y 6 horas, aún más preferiblemente entre 3 y 6 horas. La duración del tratamiento ha de ser tal que las cápsulas de polen no pierdan su capa de intina. Así, en una realización preferida, la etapa (b) se lleva a cabo con ácido fosfórico durante un periodo comprendido entre 1 y 6 horas. En una realización preferida, la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura superior a la temperatura ambiente, preferiblemente entre 30 °C y 100 °C, más preferiblemente entre 50 y 80 °C, aún más preferiblemente entre 60 y 80 °C.

La etapa (c), que comprende incubar las cápsulas huecas obtenidas en la etapa anterior, con un nanosistema que comprende un compuesto farmacéuticamente activo, permite encapsular los nanosistemas en el interior de dichas cápsulas, mediante un sencillo proceso de incubación. Dichos nanosistemas son los explicados en detalle en este documento, en la sección dedicada a los nanosistemas y ejemplificados de manera no limitante en la sección

de los ejemplos. En una realización particular, la etapa (c) se lleva a cabo sin disolvente orgánico, pudiendo llevarse a cabo en presencia de agua. En otra realización particular, la etapa (c) se lleva a cabo bajo agitación, preferiblemente en condiciones de movimiento rotatorio. En otra realización particular, la etapa (c) se lleva a cabo a una presión inferior a la presión atmosférica. Preferiblemente la presión está comprendida entre 0,1 y 500 mbar, preferiblemente entre 1 y 250 mbar, más preferiblemente entre 1 y 100 mbar, aún más preferiblemente entre 10 y 100 mbar. En otra realización particular, la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura igual o superior a la temperatura ambiente, preferiblemente superior a 30 °C y preferiblemente inferior a 50 °C. La etapa (c) puede llevarse a cabo durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 1000 minutos, preferiblemente entre 1 y 120 minutos, más preferiblemente entre 1 y 60 minutos y aún más preferiblemente entre 20 y 40 minutos.

En una realización particular del procedimiento de la invención, los nanosistemas se preparan mediante una técnica de desplazamiento de solvente. En particular, los nanosistemas pueden prepararse colocando en contacto los ingredientes necesarios para la obtención de una nanoemulsión. En una realización preferida, se mezcla el compuesto farmacéuticamente activo con un componente aceitoso y un surfactante en un disolvente orgánico, y esta mezcla se pone en contacto con polisacáridos, poliaminoácidos o polipéptidos en un disolvente acuoso. Una vez formada la emulsión, se evapora la parte orgánica y los nanosistemas (que no son solubles en agua) pueden recuperarse mediante, por ejemplo, centrifugación. En una realización más preferida, el compuesto farmacéuticamente activo, el componente aceitoso y/o el surfactante se seleccionan de los que se encuentran descritos como preferidos más arriba, en la sección dedicada a los nanosistemas. El disolvente a emplear dependerá del nanosistema, siempre y cuando permita su obtención. En una realización más preferida, el disolvente orgánico se selecciona de acetona o etanol.

La etapa (d), que comprende el paso de recubrir con un excipiente farmacéuticamente aceptable las cápsulas que comprenden en su interior los nanosistemas resultantes de la etapa anterior, permite obtener las micropartículas de la invención, que comprenden el recubrimiento de un excipiente farmacéuticamente aceptable sobre las cápsulas de polen purificadas, que comprenden una capa de intina y de exina, y un nanosistema en su interior. En una realización particular, la etapa (d) comprende poner en contacto las cápsulas de la etapa anterior con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el recubrimiento se lleva a cabo mediante la técnica de recubrimiento mecánico en seco (mezcla sólida), secado por pulverización, o liofilización. Más preferiblemente, se lleva a cabo mediante liofilización. En una realización particular, el recubrimiento se lleva a cabo durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 minuto y 48 horas, preferiblemente entre 1 minuto y 30 horas. En una realización preferida, si el recubrimiento se lleva a cabo mediante

liofilización, la duración se ve comprendida entre 1 hora y 30 horas, preferiblemente entre 10 y 30 horas, más preferiblemente entre 20 y 30 horas.

Micropartícula obtenible según el procedimiento

Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula para liberación pulmonar, caracterizada porque se obtiene según el método del segundo aspecto. Este aspecto define la micropartícula en su sentido más amplio tal y como se describe en este documento, así como la micropartícula que comprende cualquiera de las realizaciones particulares y/o preferidas descritas en el presente documento. Asimismo, por los mismos motivos, se considera que la micropartícula obtenible según el método de la invención incluye el método de obtención descrito de manera más amplia, así como el método de obtención que comprende cualquiera de las realizaciones particulares y/o preferidas descritas en el presente documento.

Composición farmacéutica

Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una micropartícula según el primer o tercer aspecto, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En este contexto, el excipiente farmacéuticamente aceptable no forma parte de la micropartícula, y se añade una vez preparada la micropartícula con el propósito de mejorar alguna propiedad de interés para la vía de administración pulmonar, como por ejemplo la dispersabilidad o protección contra humedad, o como diluyente. Así, el excipiente se selecciona de excipientes compatibles con administración pulmonar. En una realización particular, el excipiente se selecciona de tensioactivos, aminoácidos, azúcares, lípidos, fitoesteroles, y/o polímeros biodegradables.

Ejemplos de aminoácidos son la leucina y/o la trileucina. Ejemplos de azúcares son lactosa, alginato, manitol, trehalosa y/o pululano. Ejemplos de lípidos son el estearato de magnesio o calcio, y/o fosfolípidos. Ejemplos de polímeros biodegradables son la celulosa microcristalina, el poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) y/o el quitosano.

Usos médicos

Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula según el primer o tercer aspecto, o una composición farmacéutica según el cuarto aspecto, para su uso en medicina.

Un sexto aspecto de la presente invención se dirige a una micropartícula según el primer o tercer aspecto, o una composición farmacéutica según el cuarto aspecto, para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el pulmón.

En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en asbestosis, asma, bronquiectasia, bronquitis, bronquiolitis, tos crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad pulmonar intersticial (EPI), cáncer de pulmón, pleuritis, neumonía, embolia pulmonar, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, sarcoidosis y enfermedades víricas o bacterianas. En una realización preferida, las enfermedades víricas son las causadas por SARS, MERS, hantaviridae, influenzavirus, rinovirus o virus respiratorio sincicial humano. En una realización preferida, las enfermedades bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en tos ferina, la neumonía bacteriana y tuberculosis.

En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, la enfermedad es tuberculosis.

El aspecto sexto de la presente invención puede definirse igualmente de manera alternativa. Así, este aspecto va dirigido al uso de las micropartículas de la invención, o de las micropartículas obtenibles según el procedimiento de la invención, o de la composición farmacéutica, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el pulmón. Una segunda forma alternativa de definir este aspecto es un método de tratamiento de enfermedades relacionadas con el pulmón, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de las micropartículas de la invención, o de las micropartículas obtenibles según el procedimiento de la invención, o de la composición farmacéutica.

Inhaladores

En una realización particular, la micropartícula de la invención se administra mediante un sistema de administración pulmonar, preferiblemente seleccionado de nebulizadores, inhaladores presurizados de dosis medida (PMDI) o inhaladores de polvo seco (DPI). En una realización preferida, se administra empleando un inhalador de polvo seco.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, el tratamiento se realiza por administración mediante un nebulizador, un inhalador presurizado de dosis medida, o un inhalador de polvo seco, preferiblemente un inhalador de polvo seco.

Parte experimental

Los ejemplos de la presente divulgación describen la síntesis de cápsulas de polen purificadas que comprenden una capa de intina y una capa de exina (Ejemplo 1), el procedimiento de recubrimiento de las cápsulas con un excipiente farmacéuticamente aceptable (Ejemplo 2), la síntesis de nanosistemas que comprenden protamina y el fármaco rifabutina (Ejemplo 3), y la encapsulación de los nanosistemas en las cápsulas de polen (Ejemplo 4).

Los restantes ejemplos de la presente divulgación describen asimismo la caracterización de las cápsulas y de los nanosistemas, mediante análisis estructural, termoanalítico y aerodinámico. El perfil de liberación de rifabutina se evaluó en medios de pulmón simulados y la distribución de la micropartícula se evaluó en un modelo de pulmón in vitro. Los ejemplos demuestran que el recubrimiento de las cápsulas de polen mejora su distribución en el pulmón, con una encapsulación y liberación exitosas de rifabutina. Estos ejemplos sirven para ilustrar realizaciones de la invención, pero que en ningún caso se deben considerar limitativos.

Materiales y Métodos

La rifabutina se adquirió de *Chemos GmbH* (Alemania). El sulfato de protamina de bajo peso molecular (5 kDa) se adquirió de *Yuki Gosei Kogyo, Ltd* (Japón). El estearato de polietileno glicol 40 (PEGst 40) fue proporcionado por *Croda Chemicals Europe Ltd.* (Reino Unido) y el glicocolato sódico (SGC) fue adquirido a *Dextra laboratories Ltd.* (Reino Unido). El Miglyol® 812 (triglicérido caprílico/cáprico/succínico) fue obtenido de *IOI Oleo GmbH* (Alemania). La sal 4-clorobenzenosulfonato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD) fue adquirida a *Thermo Fisher Scientific* (EEUU). La sal bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), el suero bovino fetal (FBS) y el PSG (del inglés Penicillin-Streptomycin-Glutamine) se compraron a *Sigma-Aldrich*. El medio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM) se obtuvo de *GIBCO® (Thermo Fisher Scientific, España)*. La línea celular *Raw 264.7* se obtuvo de *ATCC* (Manassas, VA, EEUU). El polen de girasol crudo (*Helianthus annuus*) fue comprado a *Pharmallerga* (Lisov, Czech Republic) y se compraron flores de manzanilla secas (*Matricaria chamomilla*) a *Soria Natural* (Soria, España). El D-manitol se compró a *Molar Chemical KFT* (Hungría). La L-leucina se compró a *AppliChem GmbH* (Alemania). Los demás reactivos eran de grado analítico y se emplearon sin purificación adicional.

Mediciones analíticas

Las muestras se caracterizaron por FT-IR (Thermo Nicolet AVATAR 330, Waltham, MA, EE. UU.) con una resolución de 4 cm⁻¹ en el rango de número de onda de 400–4000 cm⁻¹, y los espectros de FT-IR se analizaron utilizando el software Spectragryph v1.2.16.1.

Las muestras se caracterizaron por calorimetría de barrido diferencial (DSC) empleando un DSC Mettler-Toledo 821e (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Alemania) en el rango de temperatura de 30 a 450 °C con purga constante de argón, y los espectros se analizaron con el programa de análisis térmico STARe V9.1 (Mettler Inc., Schwerzenbach, Suiza).

- 5 La cristalinidad de las muestras se determinó mediante difracción de rayos-X de muestras de polvo (XRPD) utilizando el difractómetro Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Alemania. Las condiciones fueron: objetivo de Cu, filtro de Ni, voltaje de 40 kV, amperaje de 40 mA, constante de tiempo de 0,1° /min, y paso angular 0,010° (intervalo 3–40°). Los difractogramas se evaluaron con el software de difracción DIFFRACplus EVA (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Alemania).

La morfología de las muestras se determinó mediante SEM (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokio, Japón) después de recubrir las muestras con oro-paladio, en una atmósfera de argón.

- 15 La encapsulación fue estudiada por microscopia de láser confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy, SP5 Leica AOBs-SP5, Leica Biosystems Nussloch GmbH). Las mediciones de fluorescencia se realizaron a la longitud de onda de excitación del colorante DiD (λ_{max} =640 nm) y emisión (λ_{max} = 675 nm) y los fluoróforos naturales del polen se excitaron a λ_{max} =405 nm, 492 nm y 561 nm, y se recolectaron con filtros de emisión de λ_{max} = 414-479, 505-554 y 571-635 nm.

- 20 La significancia estadística de la diferencia entre las medias se determinó mediante GraphPad Prism 8 y OriginPro 9.0. Todos los datos se muestran como promedio $\pm$ Desv. estándar y se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías para comparar múltiples grupos independientes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $P < 0,05$.

25 Ejemplo 1. Obtención de cápsulas de polen purificadas.

Se han utilizado dos tipos de polen, ambos pertenecientes a la familia *Asteraceae*: polen de girasol (*H. annuus*), con un tamaño geométrico en torno a las 35 μm , y polen de manzanilla (*M. chamomilla*), con un tamaño geométrico de alrededor de 20 μm .

- 30 Los granos de polen de *H. annuus* y *M. chamomilla* se trataron en varios pasos de lavado consecutivos para eliminar el recubrimiento externo de la esporopolenina (pollenkitt) y los componentes celulares internos (esporoplasma) según el método descrito en Ageitos, J.M., et al.; "Purification of Hollow Sporopollenin Microcapsules from Sunflower and Chamomile Pollen Grains"; Polymers (Basel), 2021, 13, 2094.

Siguiendo la metodología descrita en Ageitos JM et al., el polen de *H. annuus* se trató con agua para extraer compuestos hidrofílicos. Este paso consistió en suspender 2 g de partículas de polen en 40 mL de agua, agitar durante 5 minutos un total de 5 repeticiones, filtrar a vacío y secar a 60 °C. El polen lavado con agua se resuspendió en 20 mL de acetona, se
 5 homogeneizó durante 5 minutos y se filtró al vacío. El polen tratado con acetona se resuspendió en 20 mL de ciclohexano durante 30 segundos, para la obtención de cápsulas desgrasadas de *H. annuus*. Para la obtención de cápsulas huecas, se incubaron las cápsulas desgrasadas con H₃PO₄ en proporción 1:10 (p/v) a 70 °C durante 5 h.

El polen de *M. chamomilla* se extrajo de 15 gramos de flores secas de manzanilla mediante
 10 infusión con acetona durante 30 minutos a 25°C. La infusión se filtró a través de tamices de acero inoxidable equipados con mallas de 50 µm y 30 µm seguido de un filtro de papel, empleando condiciones de vacío. Luego, se realizó el proceso de extracción de compuestos hidrofílicos con agua, tal como se describió anteriormente para *H. annuus*. En detalle, este paso consistió en suspender las partículas de polen extraídas de los 15 gramos de flores
 15 secas en 40 mL de agua, agitar durante 5 minutos durante 5 repeticiones filtrar a vacío y secar a 60 °C para la obtención de cápsulas desgrasadas de *M. chamomilla*. Finalmente, el polen tratado con agua (desgrasado) se incubó con H₃PO₄ en relación 1:10 (p/v) a 70 °C durante 5 h para la obtención de cápsulas huecas de esporopolenina de *M. chamomilla*.

20 Ejemplo 2. Recubrimiento de las cápsulas de polen purificadas.

La superficie de las cápsulas obtenidas en el Ejemplo 1 se recubrió con un excipiente farmacéuticamente aceptable (en este ejemplo, manitol y/o leucina) utilizando tres técnicas: (1) recubrimiento mecánico en seco (mezcla sólida); (2) secado por pulverización (o atomización); y (3) liofilización.

25 En el caso de la mezcla sólida (1), se mezcló la misma cantidad de cápsulas y excipiente farmacéuticamente aceptable (proporción de 1:1 p/p) en un vórtex durante 5 minutos.

En el caso del recubrimiento por secado por pulverización (2), se homogeneizó en agua una suspensión de excipiente farmacéuticamente aceptable y cápsulas (en una proporción 80:20, respectivamente) utilizando un agitador magnético y los polvos inhalables se produjeron con
 30 un mini secador por aspersión B-290 (*Büchi Labortechnik AG, Falwil, Suiza*). Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura de entrada de 110 °C, temperatura de salida de 80 °C (leucina) y 50 °C (manitol), capacidad del aspirador del 80 %, caudal de la bomba de alimentación del 20 % y un contenido de sólidos totales del 0,5 % (5 mg/mL de cápsulas y excipientes antes de secado).

En el caso de recubrimiento mediante liofilización (3), las cápsulas y los excipientes farmacéuticamente aceptables en agua se liofilizaron durante 24 h utilizando el aparato Scanvac, Coolsafe 100-9 (*LaboGeneApS, Lyngø*, Dinamarca), en una proporción de 1:1 (p/p) y un contenido total de sólidos del 0,5 % (5 mg/mL de cápsulas y excipientes antes de liofilizado). La posterior determinación del rendimiento del proceso se calculó por gravimetría. Las resultantes cápsulas recubiertas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior caracterización.

Ejemplo 3. Obtención de nanosistemas de protamina y rifabutina.

- Los nanosistemas de protamina cargados con rifabutina se prepararon mediante la técnica de desplazamiento de solvente siguiendo un procedimiento adaptado a partir del descrito en Thwala, L.N.; Beloqui, A.; Csaba, N.S.; González-Touceda, D.; Tovar, S.; Dieguez, C.; Alonso, M.J.; Préat, V. *The Interaction of Protamine Nanocapsules with the Intestinal Epithelium: A Mechanistic Approach. J. Control. Release* **2016**, *243*, 109–120.
- Un núcleo oleoso de 29,5 mg de Miglyol®812, 2,5 mg de SGC, 8 mg de PEGst-40 y rifabutina (5% teórico de fármaco sobre el peso total de nanosistema) se disolvió en acetona en un volumen final de 2,5 mL y se vertió sobre 5 mL de una fase acuosa de 1,5 mg/mL de protamina. La formulación se dejó bajo agitación magnética a 1.000 rpm durante 10 min. El disolvente orgánico se evaporó en condiciones de vacío (Rotavapor R-215, Büchi, Suiza) y los nanosistemas se aislaron por centrifugación (Hermle Labnet universal centrifuge Z323K, Labnet international) a 15.000 g a 15 °C durante 1 h. La formulación aislada se resuspendió en agua ultrapura.

Para evaluar la distribución de los nanosistemas en las cápsulas de polen, los nanosistemas de protamina cargados con rifabutina se marcaron incorporando 50 µg de DiD en la fase orgánica antes de la formación del nanosistema. Los nanosistemas de protamina cargados con rifabutina (con y sin DiD) se analizaron mediante dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano-ZSTM, Malvern Panalytical) y el análisis se realizó por triplicado, a 25°C, y con un ángulo de detección de 173°. La eficiencia de encapsulación de rifabutina se cuantificó mediante un sistema Acquity UPLC H-Class Plus equipado con una columna C18 (simetría Waters® de 1,7 µm, 2,1 x 50 mm) siguiendo un protocolo desarrollado por Rouco et al. [Rouco, H.; Diaz-Rodriguez, P.; Gaspar, D.P.; Gonçalves, L.M.D.; Cuerva, M.; Remuñán-López, C.; Almeida, A.J.; Landin, M. *Rifabutin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers as a Tool in Oral Anti-Mycobacterial Treatment of Crohn's Disease. Nanomaterials* 2020, *10*, 1-18]. Los resultados están descritos en el Ejemplo 9.

Ejemplo 4. Obtención de micropartículas para liberación pulmonar según la invención.

La eficiencia de encapsulación, la capacidad de carga y el contenido de las cápsulas se estudiaron en una relación de masa fija de 1:1 (p/p). El proceso de carga (encapsulación) se realizó poniendo en contacto los nanosistemas descritos en el Ejemplo 3 con las cápsulas descritas en el Ejemplo 1, en condiciones de movimiento rotatorio (150 rpm) y vacío (50 mbar) a 37 °C durante 30 minutos.

Para la determinación de los nanosistemas no encapsulados, se resuspendieron las cápsulas en agua, se centrifugaron durante 1 min a 15.000 g a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante empleando una jeringa. Las muestras se filtraron y liofilizaron durante 24 h, y la encapsulación de los nanosistemas se determinó por gravimetría. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Una vez cargadas con los nanosistemas, las cápsulas fueron recubiertas. Para ello, se liofilizaron las cápsulas que comprendían los nanosistemas durante 24 h utilizando el aparato Scanvac, Coolsafe 100-9 en presencia de manitol/leucina en una proporción de 1:0,5:0,5 (p/p, cápsulas:manitol:leucina) en un contenido final de sólidos de 0,5% (5 mg/mL de cápsulas y excipientes antes de secado). Las micropartículas de la invención se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Ejemplo 5. Estudio aerodinámico de cápsulas de polen purificadas.

El diámetro aerodinámico es uno de los principales factores, sino el más importante, a la hora de determinar cómo se depositan las partículas en las diferentes regiones del tracto respiratorio.

El perfil de distribución *in vitro* se evaluó utilizando un Impactador de Cascada Andersen (ACI, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Reino Unido). La metodología siguió los requisitos de la Farmacopea estadounidense y Ph. Eur. 2.9.18. El ACI separa las partículas según su diámetro aerodinámico por etapas de 1 a 6 (8,60, 6,50, 4,40, 3,20, 1,90, 1,20, 0,55 y 0,26 µm). Justo debajo de la última etapa se colocó un filtro de fibra de vidrio (Pall Corporation, 1 µm, México). Las diferentes etapas se recubrieron con una solución de 1 + 99 % p/p de Span 80 + ciclohexano para evitar el rebote de las partículas. Se cargaron 8 mg de muestra en 4 cápsulas de gelatina dura (transparentes, tamaño 3, Capsugel, Alemania) y se aerosolizaron utilizando un inhalador de polvo seco (DPI) de dosis única Breezhaler® (Novartis International AG, Basilea, Suiza). El contenido de las cuatro cápsulas de gelatina dura se descargó para cada

experimento y los experimentos se realizaron por triplicado. El caudal se ajustó a 60 L/min utilizando un caudalímetro DFM 2000 (*Copley Scientific, Nottingham, Reino Unido*), y el tiempo de duración de la prueba fue de 4 s. El dispositivo DPI, la boquilla, el puerto de inducción, las etapas del impactador y el filtro se pesaron antes y después del experimento, y los parámetros (MMAD, FPF y ED) se cuantificaron por gravimetría.

El diámetro aerodinámico, MMAD, se determinó trazando el porcentaje acumulativo de masa para cada etapa en una escala de probabilidad frente al diámetro aerodinámico de la etapa en una escala logarítmica. La fracción de partículas finas (FPF, del inglés *Fine Particle Fraction*) se estableció como el porcentaje de muestra $<5 \mu\text{m}$, mientras que la dosis emitida (ED, del inglés *Emitted Dose*) fue el porcentaje de muestra que sale del dispositivo y llega al impactador. El diámetro aerodinámico también se confirmó utilizando el software informático Aerosizer® después de la aerosolización de la muestra en un Aerosizer® (TSI Instruments Ltd. UK) conectado con Aero-Disperser®, realizando mediciones directas del tiempo de vuelo. Se colocó una pequeña cantidad de muestra en un muestreador del aerodispersor y las mediciones se realizaron utilizando un corriente láser de 41 mA, un tipo de boquilla de 200 μm , un rango de tamaño de 0,1 a 200 μm y una duración de 30 segundos.

Los parámetros (MMAD, FPF y ED) de las cápsulas de polen purificadas preparadas según el Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades aerodinámicas *in vitro* de las cápsulas de polen purificadas preparadas según el Ejemplo 1. FPF: fracción de partículas finas; ED: dosis emitida; MMAD: diámetro aerodinámico de la masa mediana; ETR: región extratorácica; TBR: región traqueobronquial; y PR: región pulmonar. Los datos representan valores promedios $\pm$ desviación estándar, $n=3$ mediciones independientes.

Partícula de polen	FPF (%)	ED (%)	MMAD (μm)	ETR (%)	TBR (%)	PR (%)	Densidad (g/cm^3)
<i>M. chamomilla</i> hueca	10 ± 3	86 ± 9	8 ± 1	84 ± 3	12 ± 1	2 ± 1	0.14
<i>M. chamomilla</i> desgrasada	3 ± 1	94 ± 7	16 ± 2	95 ± 3	3 ± 2	-	0.44
<i>H. annuus</i> hueca	7 ± 5	89 ± 11	11 ± 4	91 ± 4	5 ± 1	2 ± 1	0.13
<i>H. annuus</i> desgrasada	2 ± 1	70 ± 19	15 ± 1	78 ± 4	1 ± 0	-	0.38

Todas las cápsulas mostraron una dosis emitida óptima del dispositivo (entre 70-94%). Sin embargo, estos parámetros fueron especialmente notables en el caso de las cápsulas de polen huecas, donde se obtuvo un diámetro aerodinámico (MMAD) de 8 y 11 μm y una FPF de 10 y 7%, respectivamente.

Estas distribuciones de tamaño de partículas se confirmaron además mediante mediciones de tiempo de vuelo utilizando un Aerosizer LD. Las muestras exhibieron distribuciones de tamaño aerodinámico similares para el conjunto de condiciones experimentales, siendo 8 ± 2 μm y 14 ± 1 μm para las cápsulas de *M. chamomilla* huecas y desgrasadas, respectivamente, y 10 ± 1 μm y 16 ± 1 μm para las cápsulas huecas y desgrasadas de *H. annuus*.

Los granos de polen y las esporas de hongos se depositan por impacto inercial en la región orofaríngea y, como se muestra en la Figura 1, la mayor parte de las cápsulas se retuvo en la región extratorácica (región A). Esto fue especialmente notable en el caso de las cápsulas de polen desgrasadas, donde las mayores densidades de las cápsulas ($0,38 \text{ g/cm}^3$ para *H. annuus* y $0,44 \text{ g/cm}^3$ en el caso de *M. chamomilla*) llevaron a una mayor retención en el inhalador (región 1) y la tráquea (región 3), mientras que en el caso de las partículas de polen huecas (con densidades de $0,13 \text{ g/cm}^3$ para *H. annuus* y $0,14 \text{ g/cm}^3$ para el caso de *M. chamomilla*) se pudieron detectarse en la región pulmonar (región C).

Sin embargo, la distribución de las partículas en los pulmones fue inadecuada.

Ejemplo 6. Estudio aerodinámico de cápsulas de polen purificadas recubiertas.

El perfil de distribución *in vitro* de las cápsulas recubiertas, preparadas como se describe en el Ejemplo 2, se evaluó utilizando el Impactador en cascada de Andersen como se describe en el Ejemplo 5. Los parámetros (MMAD, FPF y ED) se cuantificaron por gravimetría.

La Figura 2 y la Figura 3 muestran el porcentaje de cápsulas depositadas en el inhalador, la boca y la tráquea en las etapas -1 a 6 y en el filtro. Aunque el recubrimiento de las cápsulas no influyó significativamente en su mejor salida del inhalador, se observó una menor proporción de muestra tanto en la tráquea como en la primera etapa del Impactador, en comparación con las no recubiertas.

El perfil aerodinámico *in vitro* calculado por el software Inhalytix™ (Copley Scientific LTD., Nottingham, Reino Unido) se presenta en la Tabla 2. Esta distribución está muy condicionada por la disminución del diámetro aerodinámico. Los valores de la fracción de partículas finas fueron 2,5 veces más altos después del recubrimiento. Las cápsulas recubiertas escaparon de las primeras etapas y se distribuyeron uniformemente en mayor porcentaje en la región traqueobronquial, hasta un 23%. Estas cápsulas recubiertas finalmente llegaron a las últimas etapas del Impactador, que corresponden a la región pulmonar, con valores de hasta 8% para las cápsulas de *M. chamomilla* recubiertas con manitol/leucina, que fue 4 veces superior a cápsulas sin recubrir.

Tabla 2. Propiedades aerodinámicas *in vitro* de las cápsulas recubiertas con distintos vehículos (Ejemplo 2). FPF: fracción de partículas finas; ED: dosis emitida; MMAD: diámetro

aerodinámico de la masa mediana; ETR: región extratorácica; TBR: región traqueobronquial; y PR: región pulmonar. Los datos representan valores promedios $\pm$ desviación estándar, $n=3$ mediciones independientes.

Vehículo		FPF (%)	ED (%)	MMAD (μm)	ETR (%)	TBR (%)	PR (%)
Leucina	<i>M. chamomilla</i>	26 ± 10	90 ± 6	7 ± 2	72 ± 4	23 ± 2	7 ± 1
	<i>H. annuus</i>	19 ± 4	88 ± 16	8 ± 0	76 ± 4	17 ± 2	4 ± 0
Manitol	<i>M. chamomilla</i>	24 ± 7	89 ± 5	7 ± 2	69 ± 4	21 ± 2	5 ± 1
	<i>H. annuus</i>	25 ± 2	90 ± 7	8 ± 0	73 ± 5	19 ± 1	6 ± 0
Leucina/Manitol	<i>M. chamomilla</i>	27 ± 14	94 ± 12	7 ± 3	72 ± 5	21 ± 3	8 ± 1
	<i>H. annuus</i>	20 ± 3	85 ± 9	8 ± 0	72 ± 6	17 ± 2	4 ± 1

5 Ejemplo 7. Caracterización adicional de las cápsulas de polen purificadas recubiertas.

Las cápsulas de polen recubiertas según los tres métodos descritos en el Ejemplo 2 se caracterizaron por FT-IR. Los picos de los grupos funcionales de las cápsulas huecas de *M. chamomilla* podrían dividirse en tres regiones: (1) Una señal amplia de 3300 cm^{-1} (vibración O-H), seguida de una señal asimétrica y simétrica de CH_2 y CH_3 en 2928 y 2854 cm^{-1} ,
 10 respectivamente; (2) Una región entre $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, donde los picos alrededor de 1686 y 1579 cm^{-1} corresponden a cetonas aromáticas y al grupo carboxilato ($-\text{COO}-$), respectivamente; y (3), la región de huellas dactilares (o *fingerprint*, a $1500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$), característico para cada tipo de polen. Como las esporopoleninas constituyen un grupo de biopolímeros a base de ácidos fenilpropanoides, muestran bandas de espectro vibratorio
 15 debido a las vibraciones de los anillos aromáticos a 1515 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$), una señal a aproximadamente 1056 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$) que se atribuye a los carotenoides y picos relacionados con enlaces C-H en estructuras de anillos aromáticos a 845 , 1170 y 1440 cm^{-1} .

La presencia de los vehículos farmacéuticamente aceptables leucina y manitol adheridos a la superficie exterior de las cápsulas (esporopolenina) pudo observarse después del
 20 procedimiento descrito en el Ejemplo 2 por la presencia del grupo amino característico de la L-leucina, ($\text{C}-\text{N}$, $1020\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ y $\text{R}-\text{NH}_2$ en $1590\text{-}1627\text{ cm}^{-1}$) y en 929 , 959 , 1194 y/o 1209 cm^{-1} para el manitol.

Se observó que los picos de las cápsulas no mostraron cambios significativos tras el recubrimiento mecánico seco (1). Los inventores consideran que una posible razón podría ser
 25 la ausencia de interacción química covalente entre la cápsula de polen y el vehículo, sino una interacción de adhesión.

Además, las cápsulas de polen recubiertas preparadas según el Ejemplo 2 también se caracterizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para evaluar la asociación

entre las cápsulas y el vehículo. Las cápsulas huecas de *M. chamomilla* no sufrieron cambio de fase. La curva DSC de leucina, manitol, y su combinación, mostró una ligera reducción de la altura y ancho del pico endotérmico característico, con una disminución de sus entalpías de fusión de cambio de fase (AHm) (Tabla 3), lo que sugiere una disminución en la cristalinidad de los vehículos y confirma su recubrimiento exitoso en las cápsulas de *M. chamomilla*. La cantidad de vehículo asociado también se estimó asumiendo que las cápsulas de *M. chamomilla* no impiden la liberación de calor por parte de los vehículos. Se observó que la entalpía de fusión de los vehículos, para el recubrimiento mecánico en seco (mezcla sólida), disminuía significativamente en comparación con los liofilizados y los secados por pulverización (mezcla sólida<liofilización<secado por pulverización). Esta disminución del calor latente podría atribuirse a un menor recubrimiento del vehículo, que se estimó en 29, 48 y 100 % para el manitol; 0, 54 y 86% para leucina y 42, 25 y 58% para su combinación, respectivamente.

Tabla 3. Temperatura (°C) y cambio de fase (J/g) de manitol (MAN), leucina (LEU) y combinación, tras su asociación a cápsulas huecas de *M. chamomilla*, siguiendo los procedimientos del Ejemplo 2.

	Puros		Mezcla sólida		Secado pulverización		Liofilización	
	J/g	T (°C)	J/g	T (°C)	J/g	T (°C)	J/g	T (°C)
MAN	-262.19	168.83	-74.47	168.00	-262.31	167.66	-125.56	169.33
LEU	-875.09	296.66	-	-	-749.07	282.66	-473.59	252.33
MAN/LEU	-	-	-72.27	168.00	-60.57	165.50	-39.56	165.83
			-126.30	221.83	-164.76	247.66	-83.10	211.33

El rendimiento de recubrimiento fue alto, con valores de casi el 100% para el recubrimiento mecánico en seco (mezcla sólida) y > 90% al realizar la adhesión de los vehículos en el caso del recubrimiento por liofilización. Sin embargo, el secado por pulverización dio un rendimiento inferior al 5%.

De acuerdo con los datos de FTIR, DSC y parámetros de rendimiento, se seleccionó la técnica de liofilización para llevar a cabo el recubrimiento de las cápsulas huecas de *M. chamomilla*.

El efecto que los vehículos tienen en la superficie de las cápsulas se evaluó asimismo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Figura 4). Las imágenes SEM mostraron cápsulas no agregadas que conservan su geometría esférica e integridad con una superficie corrugada, así como su superficie nanoporosa.

Ejemplo 8. Estudio aerodinámico de las micropartículas para liberación pulmonar según la invención.

El perfil de distribución *in vitro* de micropartículas para liberación pulmonar que comprenden cápsulas de *M. chamomilla* preparadas como se describe en el Ejemplo 4, se evaluó utilizando el Impactador en cascada de Andersen como se describe en el Ejemplo 5. Los parámetros (MMAD, FPF y ED) se cuantificaron por gravimetría. También se evaluó el perfil de micropartículas comparativas: cápsulas que no comprendían el recubrimiento con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La Figura 5 muestra el porcentaje de micropartículas para liberación pulmonar según la invención (que comprenden una cápsula de polen, un nanosistema de rifabutina y un recubrimiento de manitol/leucina) y de micropartículas comparativas sin recubrir, depositadas en el inhalador, la boca y la tráquea en las etapas -1 a 6 y en el filtro.

Las micropartículas que encapsulan el fármaco mostraron un aumento en su diámetro aerodinámico (Tabla 4). Se observó que el recubrimiento con vehículos disminuyó significativamente el diámetro aerodinámico, el cual alcanzó un tamaño de 8 μm . La proporción de cápsulas que llegaban a región traqueal fue entre 2-3 veces mayor tras el uso de un vehículo, alcanzando valores del 20%, mientras que en la región pulmonar fueron <10%. Estos resultados sugieren una mayor exposición pulmonar de partículas porosas grandes, donde la densidad de partículas, más que su dimensión física, determina la deposición. Estas propiedades permiten una deposición más eficiente.

Tabla 4. Propiedades aerodinámicas *in vitro* de micropartículas que comprenden cápsulas de *M. chamomilla* y nanosistemas de protamina con 5% (p/p) rifabutina. FPF: fracción de partículas finas; ED: dosis emitida; MMAD: diámetro aerodinámico de la masa mediana; ETR: región extratorácica; TBR: región traqueobronquial; y PR: región pulmonar. Los datos representan valores promedios $\pm$ desviación estándar, n=3 mediciones independientes.

Vehículo	FPF (%)	ED (%)	MMAD (μm)	ETR (%)	TBR (%)	PR (%)
-	5 $\pm$ 2	74 $\pm$ 10	13 $\pm$ 4	86 $\pm$ 4	6 $\pm$ 1	-
Leucina/Manitol	25 $\pm$ 2	100 $\pm$ 7	8 $\pm$ 0	75 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1

Ejemplo 9. Caracterización adicional de las cápsulas de polen que comprenden nanosistemas, descritas en el Ejemplo 4.

Los nanosistemas preparados por la técnica de desplazamiento de solvente presentaron un diámetro hidrodinámico de 198 ± 19 nm, monodispersión (PDI<0.2) y carga superficial positiva (11 ± 10 mV). Se obtuvo una encapsulación satisfactoria, con una incorporación de rifabutina del $42 \pm 7\%$.

La eficiencia de encapsulación (EE %), la capacidad de carga (LC %) y el contenido de carga (p/p) de las muestras se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Eficiencia de Encapsulación (EE\%)} = \frac{\text{nanosistemas asociados}}{\text{total de nanosistemas}} \times 100$$

$$\text{Capacidad de Carga (LC\%)} = \frac{\text{Masa de nanosistemas}}{\text{Masa de cápsulas que comprenden nanosistemas}} \times 100$$

$$5 \quad \text{Contenido de Carga (w/w)} = \frac{\text{Masa de nanosistemas}}{\text{Masa de cápsulas}}$$

Se estudió mediante gravimetría la eficiencia de encapsulación en las partículas de polen (vacío, ratio 1:1) y se determinó que fue de 66% mientras que la capacidad de carga de las nanocápsulas fue de 71% sobre la masa total empleada. Comparativamente, la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las partículas en el caso de nanosistemas sin rifabutina fue de 59 y 58, respectivamente.

Mediante microscopía confocal, se observó que los nanosistemas encapsulados en las cápsulas de *M. chamomilla* (preparados según el Ejemplo 4) tendieron a acumularse en el interior, aunque su distribución interna no fue uniforme. El empleo de una presión más elevada (50 mbar) permitió obtener una asociación alta a la vez que aseguraba el paso del aire a través de la cápsula, de interés para su aplicación específica por vía pulmonar.

La Figura 6 enseña los espectros FTIR (A) y XRPD (B). El análisis FTIR no reveló alteración estructural de las cápsulas de esporopolenina después de cargarlas con nanosistemas, con una distribución en la cavidad interna del polen a través de sus aperturas y nanocanales presentes en la pared del polen. La incorporación de rifabutina a los nanosistemas facilitó su carga en las cápsulas de esporopolenina, en comparación con el fármaco no encapsulado, donde se detectó la presencia de rifabutina en 1068 (alcohol secundario), 1247 (C=O), 1422 y 1372 (C-H), 1602 (C=C) 1647 (N-H), 1668, 1730 (C=O) y 3207 cm⁻¹ (N-H).

La encapsulación de los nanosistemas en las cápsulas de polen también se confirmó mediante análisis XRPD. La presencia en el patrón de XRPD de un pico ancho con baja intensidad en el rango de 2θ indicó la naturaleza amorfa de las partículas de polen mientras que la rifabutina presentó una estructura cristalina con picos exhibidos en 10.75, 12.63, 15.50, 17.9, 18.9 y 22.8 2-theta. La desaparición de los picos del fármaco confirmó la inclusión efectiva del fármaco en los sistemas.

Las cápsulas de polen cargadas con los nanosistemas de rifabutina se liofilizaron posteriormente en presencia de manitol y leucina y se caracterizaron por DSC. Como se observa en los termogramas de la Figura 7, las cápsulas de polen recubiertas con

manitol/leucina exhibieron un pico a 155 °C correspondiente al manitol, seguido de una recristalización exotérmica y una fusión a 165 °C, que podría corresponderse a un cambio de una forma de manitol β a un polimorfo δ . La asociación total estimada de manitol y leucina fue del 35 %.

5 Toxicidad

Para garantizar el uso seguro de las micropartículas de la invención en usos farmacéuticos, se utilizó MTT para investigar su citotoxicidad en células Raw264.7. Así, la toxicidad *in vitro* de las micropartículas de la invención, preparadas según el Ejemplo 4, se evaluó mediante ensayo colorimétrico MTT, cuantificando el formazán insoluble en agua en células Raw 264.7 después de 24 horas de incubación de diferentes concentraciones de partículas. 24h antes del experimento, se sembraron células (10.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo DMEM (10% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina) a una densidad celular de 37 °C y 5% CO₂. Luego, el medio se reemplazó con las formulaciones y las células se incubaron durante 24 horas. Se usó medio fresco como control negativo y Triton x100 (1% v/v) como control positivo. Transcurridas 24h, se añadió 0,5 mg/mL de MTT disuelto en PBS, y las células se incubaron durante 4 h a 37°C y oscuridad. Los cristales de formazán se disolvieron mediante la adición de HCl 0,04 N en isopropanol y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas (*Synergy H1 Hybrid Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.*). La viabilidad celular (%) se calculó siguiendo la ecuación:

$$20 \quad \text{Viabilidad Celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia control negativo}}{\text{Absorbancia control positivo} - \text{Absorbancia control negativo}} \times 100$$

La actividad metabólica se cuantificó mediante la determinación de formazán después de la incubación de las micropartículas de la invención y se comparó con la actividad de los nanosistemas no encapsulados. Como se muestra en la Figura 8, se observó una toxicidad dependiente de la concentración, similar en ambas formulaciones a altas concentraciones (1 mg/mL, equivalente a 50 μ g de rifabutina), pero menor para los nanosistemas sin encapsular a concentraciones más bajas. Se obtuvieron valores de viabilidad de 69 + 18% para las cápsulas de la invención a concentraciones de 0,1 mg/mL. Asimismo, se observó una disminución de la toxicidad del fármaco a altas concentraciones (rifabutina >50% de viabilidad a 12,5 μ g/mL para Raw 264.7) tras su encapsulación, tanto en nanosistemas como en plataformas de polen.

Disolución en medio pulmonar

La liberación *in vitro* de la rifabutina incluida en los nanosistemas a partir de las micropartículas de la invención se determinó en medio pulmonar simulado (SLM) compuesto por NaCl 116

mM, NaHCO_3 27 mM, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ 5 mM, NaH_2PO_4 (H_2O) 1,1 mM, CaCl_2 0,18 mM y H_2SO_4 0,5 mM en agua destilada a pH 7,4. Se mantuvieron bajo agitación a 200 rpm y a 37 °C 10 mL del medio de disolución que contenía 4 mg de micropartículas de la invención (18.4 μg de rifabutina). Se extrajeron alícuotas de 1 mL a intervalos de tiempo preestablecidos (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min), se centrifugaron durante 1 min a 7500 g, se filtraron (filtros de 0,22 micras) y se reemplazaron por un volumen igual de medio pulmonar simulado fresco. Las muestras se analizaron mediante espectrofotómetro ($\lambda_{\text{max}} = 237 \text{ nm}$).

Se evaluó la disolución *in vitro* de rifabutina a partir de las micropartículas de la invención (*M. chamomilla*). Como se muestra en la Figura 9, la inclusión de las nanocápsulas en las micropartículas mejoró la disolución de la rifabutina en el medio en comparación con la rifabutina libre durante los primeros 40 min, con una liberación total del fármaco de $29 \pm 7 \%$ tras 1 h, mientras que fue más lenta en comparación con la liberación de rifabutina de nanosistemas no incorporados en micropartículas. Esto puede deberse a un proceso general más lento, que implica primero la liberación de los nanosistemas de las plataformas de polen y una posterior disolución del fármaco de los nanosistemas en el medio. No se observó diferencia estadística entre la disolución de rifabutina de los nanosistemas en comparación con las cápsulas hasta 50 minutos.

Los resultados se evaluaron utilizando modelos matemáticos para la cinética de liberación del fármaco. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La cinética de la liberación del fármaco *in vitro* se evaluó en orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas para dilucidar el mecanismo físico de la liberación del fármaco.

El patrón de liberación del fármaco se evaluó mediante diferentes modelos cinéticos (Tabla 5) utilizando el software DDSolver, y se evaluaron el coeficiente de determinación (R^2), el R^2 ajustado y el criterio de información de Akaike (ACI) para seleccionar el modelo que mejor se ajustaba. Se observó que la liberación de rifabutina de las cápsulas cargadas con nanosistemas se ajustaba mejor a Korsmeyer-Peppas, lo que explica la difusión del fármaco desde una matriz polimérica. El valor de n de 0,34 sugiere una difusión fickiana ($n < 0,43$).

Tabla 5. Cinética de micropartículas según la invención (nanosistemas de protamina con 5% (p/p) de rifabutina en cápsulas de *M. chamomilla* según el Ejemplo 4).

Parámetro	Orden cero	1ª orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
R^2	-3.1849	-2.3413	0.0966	0.9908
adj R^2	-3.1849	-2.3413	0.0966	0.9892
AIC	49.0335	47.1408	29.0550	7.2045
K_0	0.6125	0.0071	4.1352	9.3346

REIVINDICACIONES

1. Micropartícula para liberación pulmonar que comprende:

- una cápsula de polen purificada, que comprende una capa de intina y una capa de exina; y

- al menos un nanosistema encapsulado en dicha cápsula, en donde el nanosistema comprende un compuesto farmacéuticamente activo;

en donde la capa de exina está recubierta con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Micropartícula según la reivindicación 1, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable constituye la capa más externa de la micropartícula.

3. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable reduce al menos en 10% el diámetro aerodinámico de la masa mediana de la micropartícula, cuando se compara con una micropartícula idéntica pero sin excipiente farmacéuticamente aceptable, empleando un Impactador de Cascada Andersen.

4. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, péptidos, proteínas, polímeros polioles, carbohidratos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, fosfolípidos, y combinaciones de los mismos.

5. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en manitol, leucina, trehalosa, lactosa, albumina, dipalmitoilfosfatidilcolina, estearato de magnesio, y combinaciones de los mismos.

6. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en manitol, leucina y combinaciones de los mismos.

7. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable se encuentra en una cantidad comprendida entre el 10% y el 95% en peso, con respecto al peso de la micropartícula de la invención sin el recubrimiento.

8. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el nanosistema comprende polipéptidos, polisacáridos y/o poliaminoácidos.

9. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque el nanosistema comprende protamina.
10. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el nanosistema comprende una capa de protamina encapsulando el compuesto farmacéuticamente activo.
11. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque el nanosistema exhibe un diámetro hidrodinámico comprendido entre 100 y 500 nm, medido mediante dispersión de luz dinámica.
12. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque el nanosistema comprende un componente aceitoso.
13. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque el compuesto farmacéuticamente activo es un antibiótico.
14. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque el compuesto farmacéuticamente activo es un antibiótico para tratar la tuberculosis.
15. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizada porque el compuesto farmacéuticamente activo se encuentra en una concentración comprendida entre el 0.5% y el 20% en peso, con respecto al peso del nanosistema.
16. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada porque el compuesto farmacéuticamente activo es rifabutina.
17. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque la cápsula de polen purificada está desprovista de su capa lipídica.
18. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizada por un diámetro aerodinámico de la masa mediana de 1 a 10 μm .
19. Procedimiento para la preparación de una micropartícula según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende:
 - (a) una etapa de lavado, que comprende lavar una partícula de polen;
 - (b) una etapa que comprende tratar la partícula de polen obtenida en la etapa anterior con un medio ácido para obtener cápsulas huecas de polen purificadas;
 - (c) una etapa que comprende incubar las cápsulas huecas obtenidas en la etapa anterior, con un nanosistema que comprende un compuesto farmacéuticamente activo; y

(d) una etapa que comprende recubrir las cápsulas resultantes con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20. Micropartícula para liberación pulmonar, caracterizada porque se obtiene según el método de la reivindicación 19.

5 21. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una micropartícula obtenible según la reivindicación 20, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 22. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una micropartícula obtenible según la reivindicación 20, o composición farmacéutica según la reivindicación 21, para su uso como medicamento.

23. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una micropartícula obtenible según la reivindicación 20, o composición farmacéutica según la reivindicación 21, para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el pulmón.

15 24. Micropartícula, micropartícula obtenible, o composición farmacéutica, para su uso según la reivindicación 23, en donde las enfermedades relacionadas con el pulmón se seleccionan del grupo que consiste en asbestosis, asma, bronquiectasia, bronquitis, bronquiolitis, tos crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad pulmonar intersticial (EPI), cáncer de pulmón, pleuritis, neumonía, embolia pulmonar, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, sarcoidosis y enfermedades víricas o bacterianas.

20 25. Micropartícula, micropartícula obtenible, o composición farmacéutica, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, en donde la enfermedad es tuberculosis.

25 26. Micropartícula, micropartícula obtenible, o composición farmacéutica, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde el tratamiento se realiza por administración mediante un nebulizador, un inhalador presurizado de dosis medida, o un inhalador de polvo seco, preferiblemente un inhalador de polvo seco.

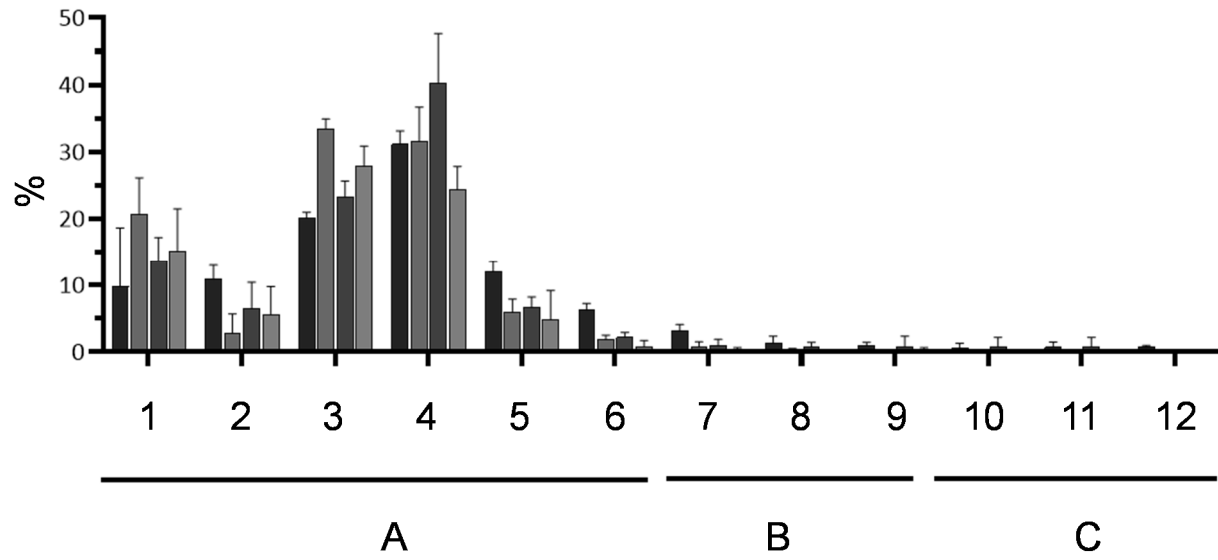


Figura 1

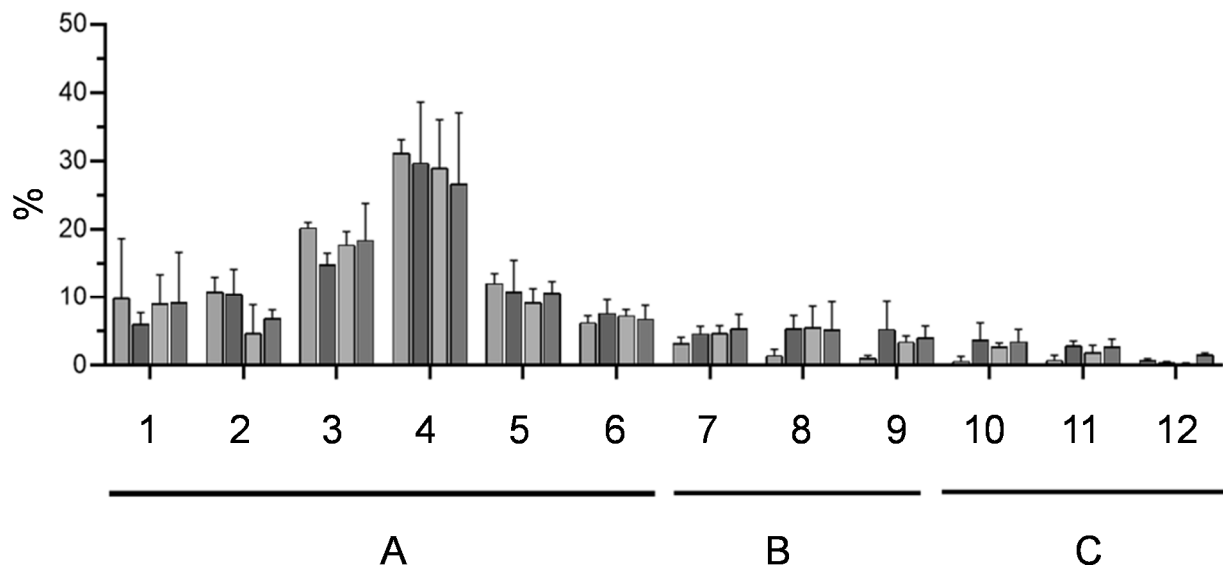


Figura 2

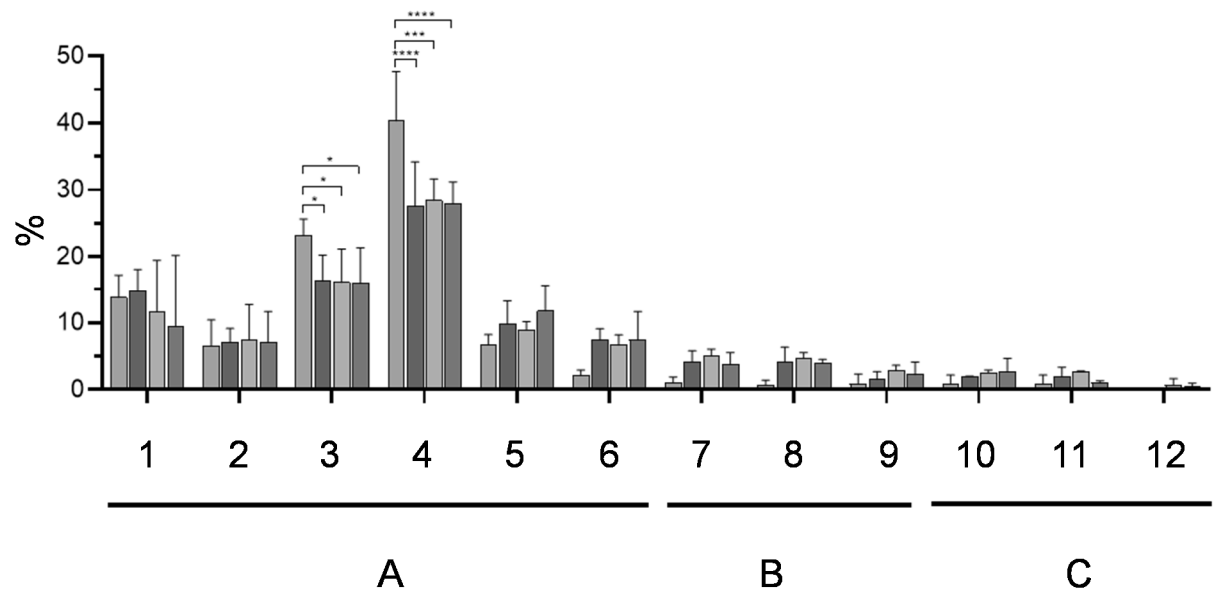


Figura 3

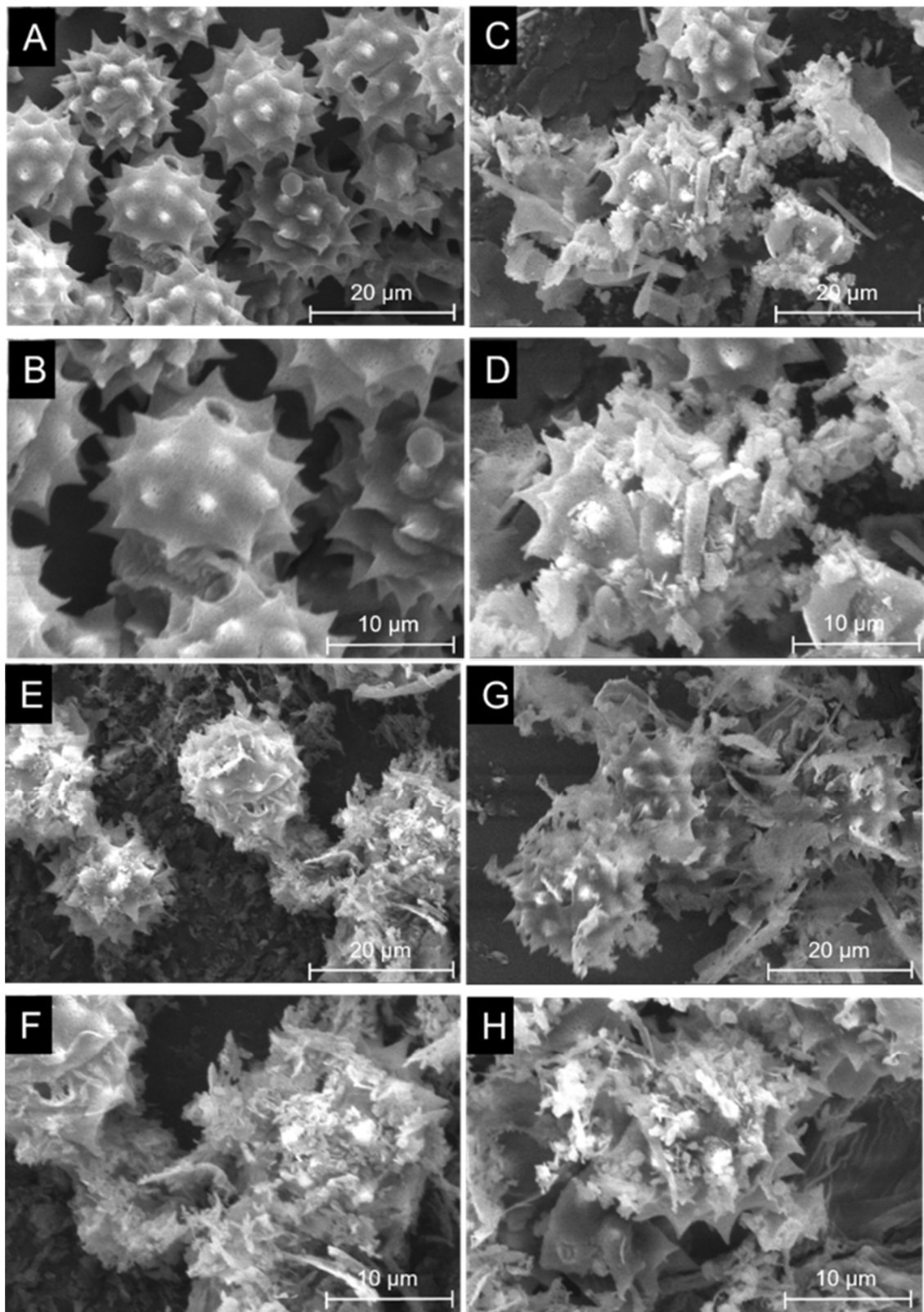


Figura 4

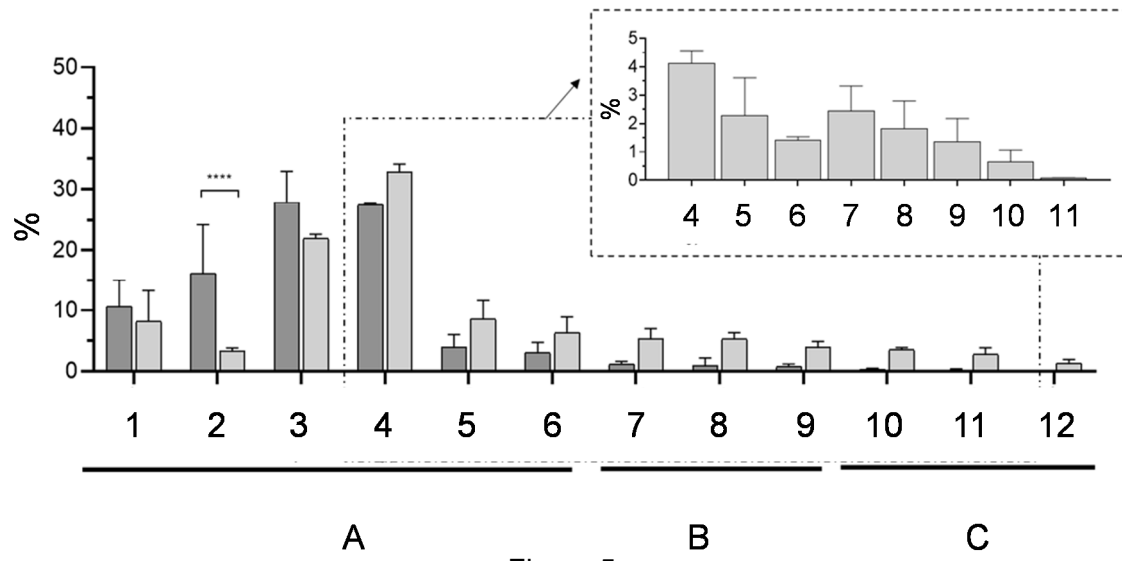


Figura 5

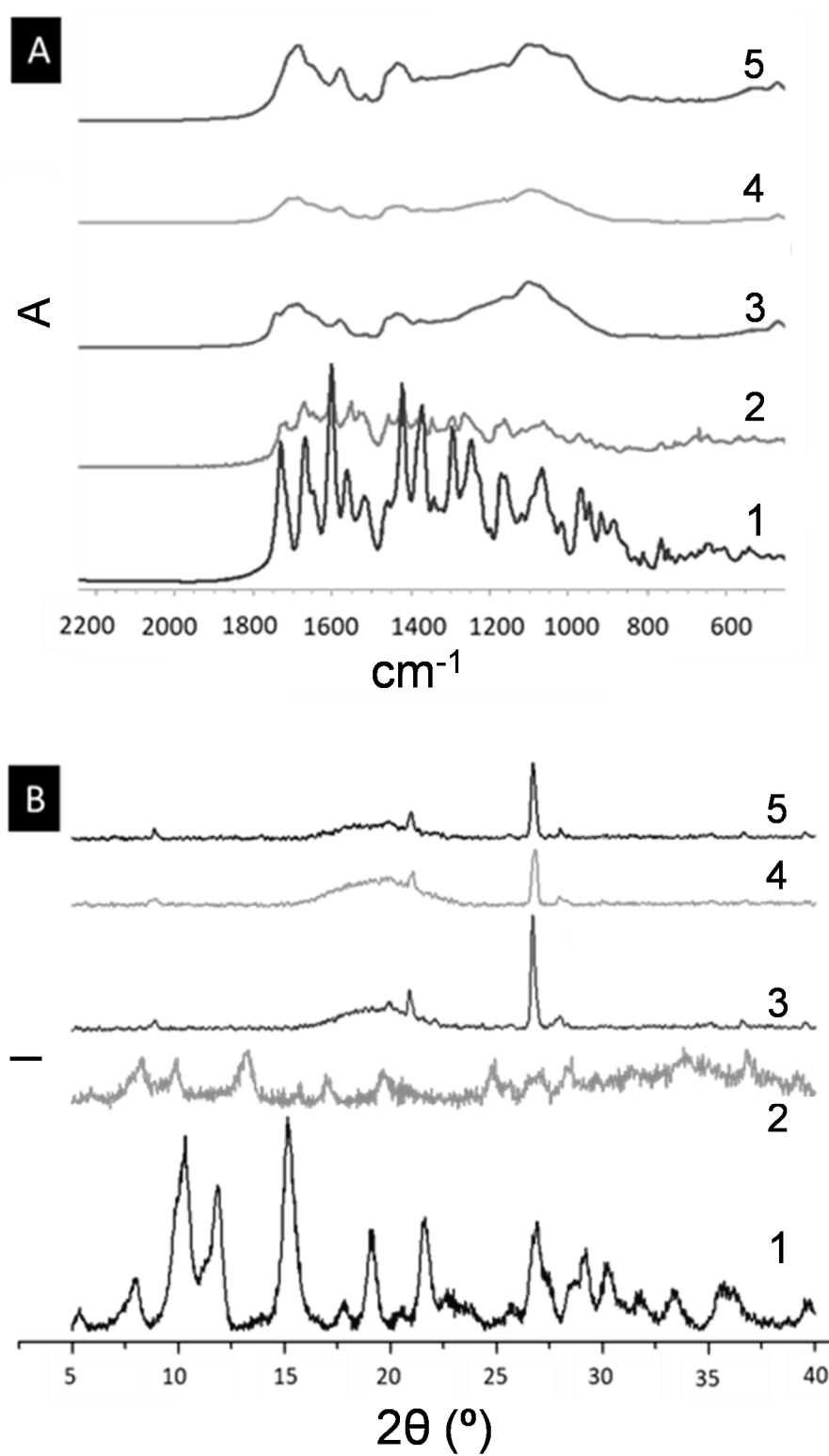


Figura 6

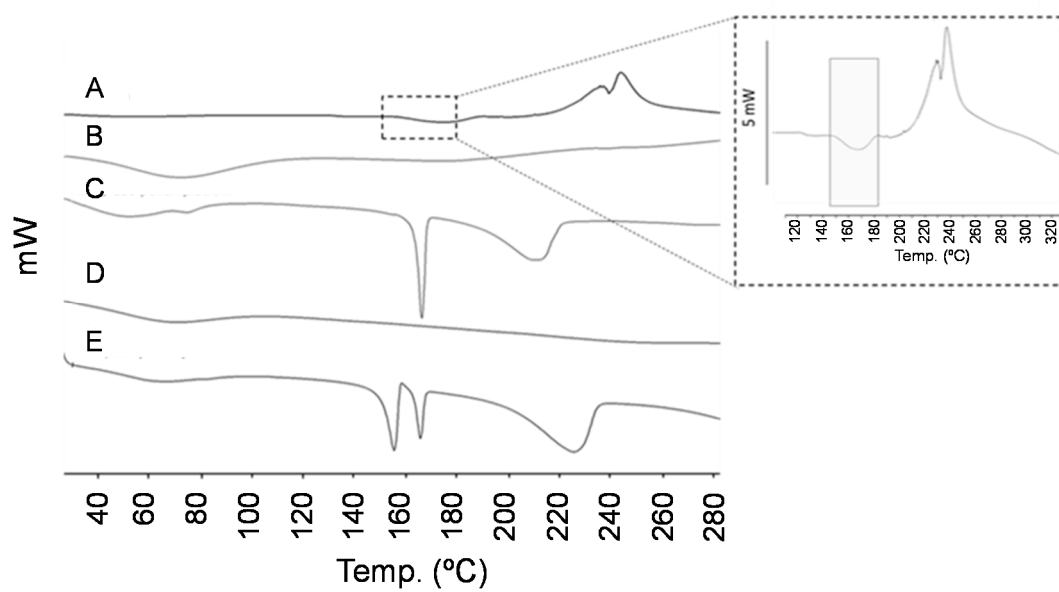


Figura 7

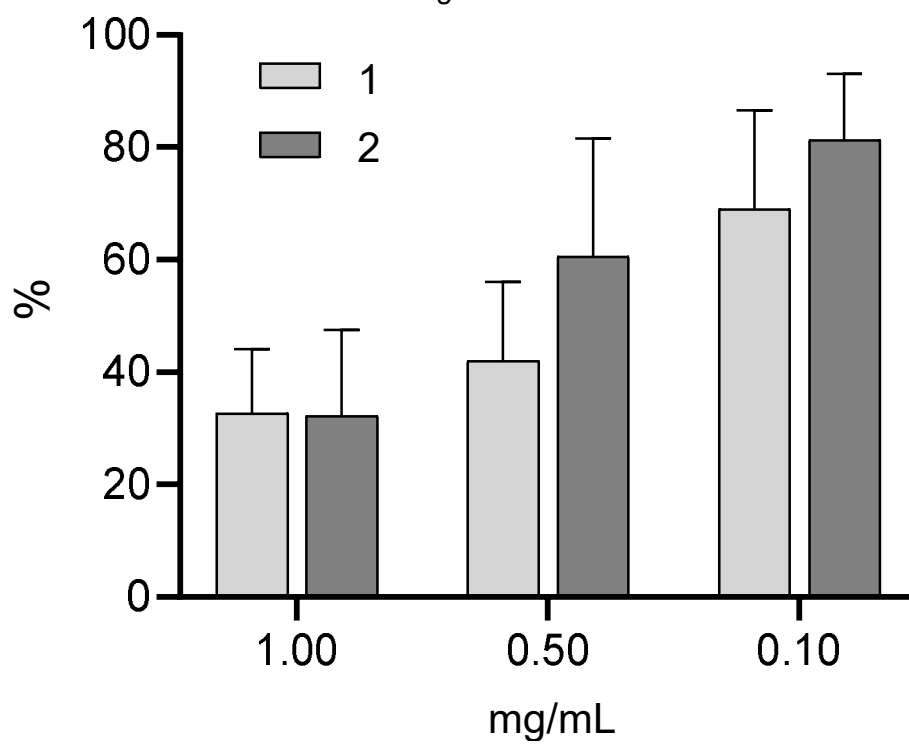


Figura 8

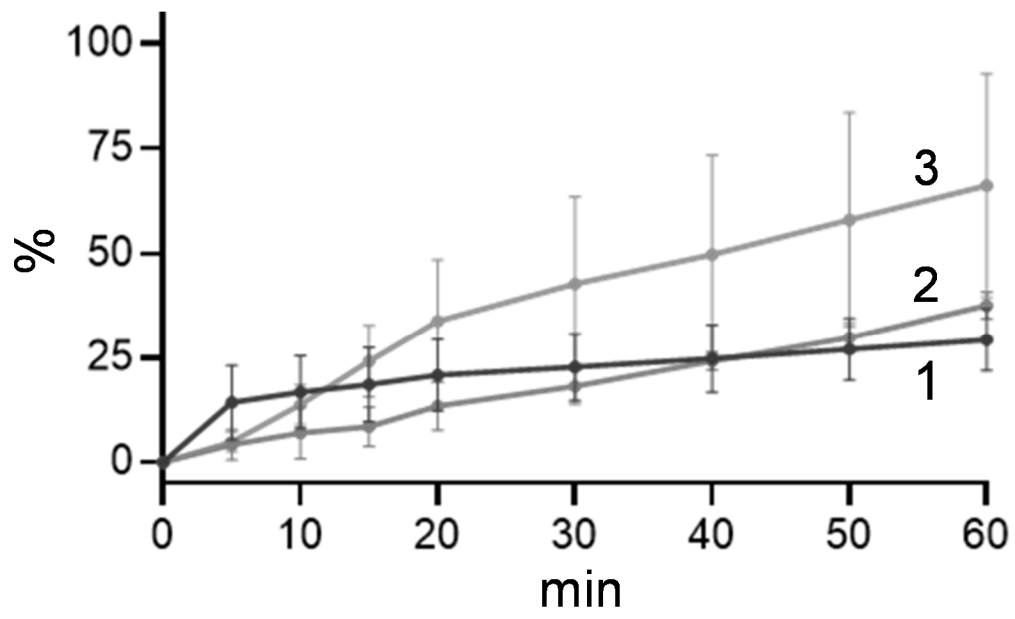


Figura 9