

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 426**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2014 PCT/US2014/073097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15103447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2014 E 14876647 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.11.2021 EP 3089737**

54 Título: **Preparaciones orales y uso de nanopartículas de rapamicina**

30 Prioridad:

31.12.2013 US 201361922800 P

16.04.2014 US 201461980095 P

21.08.2014 US 201462040000 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2022

73 Titular/es:

RAPAMYCIN HOLDINGS, LLC (100.0%)
12500 Network, Suite 105
San Antonio, TX 78249, US

72 Inventor/es:

VAIL, NEAL, K. y
VAUGHN, DANA, M.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 900 426 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparaciones orales y uso de nanopartículas de rapamicina

5 Antecedentes

1. Campo de la invención.

10 La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a una preparación farmacéutica de micropartículas para su uso en el tratamiento de una o más enfermedades oncológicas, neurológicas o autoinmunitarias en un sujeto animal (que puede ser un sujeto animal humano), que comprende:

15 i. una matriz de excipiente sólido que comprende una composición de polímero que permanece intacta cuando se expone a condiciones ácidas del canal alimentario de un animal del tipo de dicho sujeto animal y que se desintegra cuando se expone a condiciones básicas de porciones intestinales específicas de dicho canal alimentario; y

20 ii. nanopartículas de rapamicina dispersas dentro de dicha matriz de excipiente sólido, dichas nanopartículas de rapamicina comprenden un compuesto inductor de micelas, tal como colato de sodio, y un núcleo farmacéuticamente activo;

iii. dicho núcleo farmacéuticamente activo comprende rapamicina;

25 iv. dicho compuesto inductor de micelas induce naturalmente la formación de micelas dentro de una solución de dicho compuesto inductor de micelas, dichas micelas tienen propiedades que promueven la estabilidad de dicha rapamicina cuando dichas nanopartículas de rapamicina se dispersan dentro de dicha matriz; y

30 v. el método que comprende administrar por vía oral dicha preparación a dicho sujeto animal varias veces por semana durante una duración de varias semanas, en cantidades eficaces, en donde dicho sujeto animal necesita la prevención o el tratamiento, o una progresión retardada, de una o más enfermedades oncológicas, neurológicas o autoinmunitarias.

35 La presente descripción se refiere en general a la fabricación y el uso de inhibidores de mTOR para la administración oral en la prevención y el tratamiento de enfermedades médicas en seres humanos y otros animales. Más particularmente, la descripción se refiere a la fabricación y el uso de preparaciones para la administración oral que incluyen un inhibidor de mTOR y/o complejo 1 de mTOR (mTORC1) junto con polímeros protectores y estabilizadores, para la prevención y el tratamiento de enfermedades médicas, más especialmente en los campos de la oncología, la neurología y las autoinmunidades, así como también la prolongación de la vida útil sana en humanos y otros animales.

40 2. Descripción de la técnica relacionada

45 La rapamicina (también conocida como sirolimus) es un agente farmacéutico bien conocido que se ha usado durante mucho tiempo para minimizar el rechazo de órganos trasplantados. La rapamicina y sus numerosos análogos y derivados (conocidos colectivamente como "rapálogos") actúan excelentemente para inhibir la vía metabólica del mismo nombre en los mamíferos – la diana en mamíferos de la rapamicina ("mTOR"). Las funciones metabólicas críticas de la vía mTOR han llevado durante mucho tiempo a una amplia especulación sobre los posibles usos médicos de la rapamicina fuera del rechazo del trasplante de órganos. Sin embargo, a pesar del éxito con la prevención del rechazo de trasplantes, y a pesar de las muchas necesidades sentidas desde hace mucho tiempo y los enormes esfuerzos correspondientes en el desarrollo de las rapamicinas para otras indicaciones, el uso eficaz de la rapamicina para tratar o prevenir otros trastornos no ha tenido un gran éxito y ha estado muy limitado en el mejor de los casos.

55 Las formulaciones particulares (Solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 13/128,800, presentada el 11 de noviembre de 2009, publicada en la publicación núm. 2012/0064143) proporcionaron partículas o "núcleos" que contenían el ingrediente activo de la rapamicina, y esos núcleos se microencapsularon dentro de una matriz de polímero protector, para la administración oral de la rapamicina. Los núcleos de la rapamicina se microencapsularon preferentemente mediante el uso de un proceso de recubrimiento por atomización con disco giratorio con una matriz de polímero protector conocida con el nombre "EUDRAGIT® S 100". La matriz de polímero EUDRAGIT® S 100
60 consiste principalmente en un polímero de metacrilato particular que generalmente es estable a niveles de pH por debajo de 7 y se usó para proteger la rapamicina de la degradación en las condiciones ácidas del estómago. Luego, una vez que la rapamicina microencapsulada entrara en las condiciones básicas (es decir, pH superior a 7) dentro de los intestinos, la matriz protectora se disolvería y, teóricamente, la rapamicina sin degradar se absorbería a través de las paredes intestinales y se volvería biodisponible para los fines médicos previstos.

65

Desafortunadamente, la teoría y la práctica no siempre coinciden perfectamente. A pesar de la enorme esperanza de una amplia eficacia del uso de la administración por vía oral de tales preparaciones de la rapamicina microencapsulada, y a pesar de la amplia atención nacional e internacional a los Descubrimientos de 2008 (Solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 13/128,800, presentada el 11 de noviembre de 2009, publicada en la publicación núm. 2012/0064143), persistió una gran preocupación acerca de si los niveles efectivos de rapamicina podrían administrarse de manera confiable al cuerpo de esta forma. Por razones que durante mucho tiempo permanecieron inciertas en la práctica, la estabilidad de la molécula de rapamicina básica dentro de tales formulaciones ha sido menos confiable de lo deseado, y se han acumulado incertidumbres con respecto a si los niveles de absorción entérica pueden ser lo suficientemente confiables para la aceptación adecuada en el mercado de los Descubrimientos de 2008 (Solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 13/128,800, presentada el 11 de noviembre de 2009, publicada en la publicación núm. 2012/0064143).

Existen otros desafíos. Es contradictorio incluso considerar el uso de la rapamicina y otros inhibidores de mTOR para la prevención o el tratamiento de afecciones tales como la gingivitis felina o la anemia hemolítica canina. Particularmente porque una de las contraindicaciones o precauciones comúnmente asociadas con la rapamicina se relaciona con las úlceras bucales. Por diversas razones, la rapamicina tiende a provocar la rotura de las membranas mucosas de las cavidades bucales en algunos sujetos, sobre todo en determinadas dosis. Eso por sí solo disuadiría suficientemente a alguien de usar la rapamicina para estas aplicaciones.

En consecuencia, existe la necesidad de mejorar las preparaciones de la rapamicina encapsulada, preparaciones que aún aprovechan los Descubrimientos de 2008 (Solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 13/128,800, presentada el 11 de noviembre de 2009, publicada en la publicación núm. 2012/0064143) pero que mejoran diversas características de rendimiento, como la estabilidad de almacenamiento, la biodistribución, el coste de dosificación, etc.

Además, debido a que las aplicaciones potenciales son tan amplias y variadas y aun relativamente sin probar para una forma oral de la rapamicina, esa amplia variedad en sí misma presenta un impedimento para realizar el uso disponible públicamente de tal preparación. Dada la dinámica del mercado y los requisitos regulatorios de las industrias farmacéuticas, un esfuerzo exitoso para hacer realidad las modalidades de los Descubrimientos de 2008 (Solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 13/128,800, presentada el 11 de noviembre de 2009, publicada en la publicación núm. 2012/0064143), disponibles para su uso por parte del público, requeriría mucho más que minimizar las incertidumbres sobre la preparación en sí. Un esfuerzo exitoso para hacerlo debe identificar y validar una indicación particular de gran impacto para la cual los beneficios de usar una rapamicina microencapsulada serían relativamente irrefutables, y el esfuerzo también debe desarrollar los métodos y las estrategias correspondientes para abordarlo de manera eficaz y confiable.

El documento núm. US 2008/107749 A1 describe las nanopartículas poliméricas. El documento núm. WO2006/110862 A2 describe las composiciones de micelas.

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Aunque la presente invención es multifacética, puede incorporarse en numerosas formas mejoradas de rapamicinas encapsuladas y en métodos para producir y usar de forma fiable estas formas mejoradas. Las formas mejoradas de las rapamicinas encapsuladas preferentemente proporcionan nanopartículas que contienen inhibidores de mTOR dentro de una matriz de polímero protector para la administración oral de la rapamicina. El resultado no solo es más duradero y estable, sino que también es más biodisponible y eficaz para el tratamiento y la prevención de enfermedades médicas, en particular de trastornos genéticamente predispuestos y trastornos relacionados con la edad, especialmente en los campos de la oncología, la neurología y los trastornos autoinmunitarios en humanos y otros animales.

Las diversas modalidades mejoran la técnica relacionada, que incluyen optimizar la estabilidad, la capacidad de fabricación, la bioabsorción, la biodistribución, el coste de dosificación, la eficacia y similares. Aunque las modalidades que se tratan a continuación no componen una lista exhaustiva, esta especificación describe las modalidades que comprenden la rapamicina encapsulada de liberación controlada; las inclusiones de nanopartículas de rapamicina; la morfología de las nanopartículas de rapamicina; los captadores de radicales libres y los estabilizadores oxidativos; y una nanopartícula de albúmina-rapamicina.

En los métodos descritos, la composición que comprende la rapamicina puede administrarse de cualquier manera adecuada. En una modalidad preferida, la composición que comprende la rapamicina se administra por vía oral al sujeto.

Las composiciones que comprenden la rapamicina pueden incluir una construcción de nanopartículas combinada con un material portador, preferentemente una composición entérica con el fin de minimizar la degradación de la composición hasta que pase del píloro al intestino del sujeto. Las composiciones que comprenden la rapamicina también pueden incluir un material hidrófilo, hinchable, formador de hidrogel. Tales composiciones pueden estar envueltas en un recubrimiento que incluye un polímero insoluble en agua y un agente hidrófilo permeable al agua.

En algunas modalidades, el polímero insoluble en agua es un copolímero de metacrilato de metilo-ácido metacrílico. Las composiciones que comprenden la rapamicina pueden incluir además un polímero termoplástico con fines de liberación gradual o controlada de la rapamicina. Los ejemplos del polímero termoplástico incluyen polímeros acrílicos de administración de fármacos EUDRAGIT® (Evonik Industries AG, Alemania).

En algunas modalidades, las partículas de rapamicina se encapsulan o se recubren, o la composición que comprende la rapamicina se encapsula o se recubre. Para fines de referencia en estas descripciones, "microencapsulación" (y sus variaciones gramaticales) debe interpretarse como la protección de las formas de micropartículas o nanopartículas de rapamicinas (preferentemente en las formas de nanopartículas de acuerdo con las descripciones en la presente descripción) mediante la combinación de dichas partículas con un material de recubrimiento entérico o similar que se formula para resistir la degradación en condiciones ácidas. Además, las denominaciones "rapamicina microencapsulada" y "rapamicina con recubrimiento entérico" se usan indistintamente para referirse genéricamente a todas y cada una de las variaciones de rapamicinas microencapsuladas, especialmente a aquellas variaciones que se describen o sugieren particularmente en estas descripciones, y equivalentes de estas. Las excepciones en contextos particulares deben entenderse, no obstante, en la medida en que el contexto haga aclaraciones más específicas o contrarias para ese contexto. En algunas modalidades, el encapsulante o el recubrimiento usado e incorporado en las preparaciones de rapamicina con recubrimiento entérico puede ser un recubrimiento entérico. En otro aspecto de estas descripciones, las referencias generales a "prevención y tratamiento" (o similar) de una enfermedad deben interpretarse para incluir una referencia no solo a la prevención y el tratamiento de la enfermedad real, sino también al retraso o la reducción en la progresión de esa enfermedad, así como también la prevención y el tratamiento de sus precursores y secuelas.

En muchas modalidades que involucran las preparaciones de rapamicina con recubrimiento entérico, las rapamicinas dentro de la preparación de rapamicina con recubrimiento entérico se proporcionan en forma de nanopartículas que incluyen la rapamicina, en cuyos casos la designación "nanoRapa" se usa genéricamente con fines de referencia en estas descripciones, mientras que la forma de rapamicina usada puede incluir preferentemente, pero sin limitarse a, una forma encapsulada en la forma de nanopartículas designadas como "rapamicina con recubrimiento entéricoNP2g". Después de preparar las preparaciones de nanoRapa mediante cualquiera de los diversos enfoques que pueden entenderse y/o describirse en la presente descripción, la preparación de nanoRapa puede recubrirse con un recubrimiento entérico para proporcionar una preparación de rapamicina con recubrimiento entérico formada a partir de partículas de nanoRapa. Para fines de referencia en estas descripciones, la designación "e-nanoRapa" se usa genéricamente para referirse a todas y cada una de las variaciones de rapamicina con recubrimiento entérico formadas a partir de partículas de nanoRapa.

Muchos otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica, particularmente después de una revisión exhaustiva de la literatura pública en el campo, y aún más a partir de las siguientes descripciones detalladas y las ilustraciones y las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las modalidades preferidas de la invención, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Los dibujos adjuntos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar e ilustrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor al hacer referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas en la presente descripción.

La Figura 1 es una ilustración gráfica de aspectos microscópicos de un proceso preferido para producir una dispersión de formas preferidas de nanopartículas de rapamicina de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

La Figura 2 es una ilustración gráfica de dos etapas básicas en un proceso preferido para producir una dispersión de formas preferidas de nanopartículas de rapamicina de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

La Figura 3 proporciona una fotografía de una dispersión de nanopartículas de rapamicina producidas como un resultado de la Etapa 2 en el proceso preferido ilustrado en la Figura 2, junto con un gráfico de distribución de tamaño de nanopartículas para la dispersión mostrada en la fotografía.

Las Figuras 4A-4B son diagramas de flujo que ilustran las etapas detalladas de un proceso preferido más completo para producir formas preferidas de nanopartículas de rapamicina con recubrimiento entérico, que incluye el proceso para producir una dispersión de nanopartículas como se ilustra en la Figura 2, junto con etapas adicionales para microencapsular las nanopartículas de rapamicina.

La Figura 5 presenta los datos resumidos para ilustrar cómo el uso regular prolongado de las nanopartículas de rapamicina microencapsulada fue eficaz para reducir las puntuaciones de la enfermedad FCGS en el 100 % de dieciséis sujetos felinos.

- 5 Las Figuras 6A-6B ilustran los datos que respaldan que la rapamicina encapsulada aumenta la vida útil y la salud en ratones *Apc^{Min/+}*.

Las Figuras 7A-7C ilustran los datos que respaldan que la rapamicina encapsulada tiene eficacia positiva en ratones *Apc^{Min/+}*. (A) Recuento de pólipos en ratones *Apc^{Min/+}* en el momento de la muerte en ratones tratados sin rapamicina con recubrimiento entérico (grupo izquierdo, círculos sólidos), la dosis media de rapamicina con recubrimiento entérico como se describe anteriormente (grupo medio, cuadrados sólidos), o la dosis alta de rapamicina con recubrimiento entérico como se describió anteriormente (grupo derecho, triángulos sólidos). (B) La Rapa encapsulada mejora la actividad física en ratones *Apc^{Min/+}*, como se muestra al medir el número medio de las interrupciones del haz (actividad) durante dos períodos de tiempo del día, luz y oscuridad. Los ratones se trataron con dieta de control de Eudragit (columna izquierda, rayada), la dosis media de rapamicina con recubrimiento entérico como se describió anteriormente (columna central, blanco con puntos negros), o la dosis alta de rapamicina con recubrimiento entérico como se describió anteriormente (columna derecha, negro con puntos blancos). El área de comida de la jaula se excluyó. (C) La Rapa encapsulada mantiene hematocritos normales en ratones *Apc^{Min/+}*. Los ratones se trataron sin rapamicina con recubrimiento entérico (círculos negros sólidos), la dosis media de rapamicina con recubrimiento entérico (cuadrados negros sólidos) o la dosis alta de rapamicina con recubrimiento entérico (triángulos negros sólidos). La edad en el momento de los hematocritos se indica en el eje X.

Las Figuras 8A-8C ilustran los datos que respaldan que la rapamicina encapsulada inhibe el efector descendente del complejo 1 de mTOR (mTORC1), la fosforilación de la subunidad de la proteína ribosómica S6 (rpS6) por la quinasa 1 de S6 (S6K1) en el segmento distal del intestino delgado. La rapamicina con recubrimiento entérico se alimentó a ratones C57BL/6, el mismo fondo genético para la *Apc^{Min/+}*, y los intestinos se recogieron y se prepararon para inmunoensayo. (A) Inmunotransferencia que muestra la detección de rpS6 total (panel inferior), rpS6 fosforilado en Ser240/244 (panel central) y pan actina como control de carga. (B) Se cuantificaron las intensidades de señal para cada banda en (A) y se calculó la relación de rpS6 fosforilado y rpS6 total y se graficaron como un diagrama de dispersión mediante el uso del programa Prism. La significación estadística de la reducción en esta relación se determinó mediante el uso de una prueba t no apareada (Prism). Estos datos muestran que la rapamicina con recubrimiento entérico inhibió eficazmente a mTORC1 y su efector rpS6, que se sabe que desempeña un papel vital en la biogénesis de los ribosomas usados en la síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento y la proliferación celular. Este es probablemente el efecto de la rapamicina con recubrimiento entérico que inhibe el desarrollo y el crecimiento de pólipos en ratones *Apc^{Min/+}* y prolonga la longevidad. (C) Niveles en sangre de rapamicina a los 217 días (tratamiento de 174 días con rapamicina con recubrimiento entérico) en ratones tratados con rapamicina con recubrimiento entérico a 14 ppm (la dosis media de rapamicina con recubrimiento entérico como se describió anteriormente, ver grupo inferior, mostrado en cuadrados negros) y rapamicina con recubrimiento entérico a 42 ppm (la dosis alta de rapamicina con recubrimiento entérico como se describió anteriormente, ver el grupo superior, que se muestra en círculos negros sólidos).

Las Figuras 9A-9E ilustran los datos para respaldar que el microencapsulado aumenta la vida útil y sana de los ratones *Apc^{Min/+}*. (A) La rapamicina con recubrimiento entérico aumenta la vida útil de los ratones *Apc^{Min/+}*. El recuadro gris representa un intervalo de la vida útil media para ratones hembra C57BL/6J tomados de estudios previos (Winjnhoven y otros, 2005), que también es representativo de las colonias singénicas en las instalaciones para animales del Barshop Institute usadas en el presente estudio. Tenga en cuenta que el 60 % de los ratones *Apc^{Min/+}* alimentados con rapamicina con recubrimiento entérico a 42 ppm han vivido más allá de este intervalo. (B) Recuento de pólipos para ratones *Apc^{Min/+}* en el momento de la muerte. Tenga en cuenta que el primer y el tercer ratón que murieron de la cohorte a 42 ppm no tenían pólipos. (C) La rapamicina con recubrimiento entérico mejora la actividad física en ratones *Apc^{Min/+}*. Se representa gráficamente el número medio de las interrupciones del haz (actividad) para las fases de luz (inactiva) y oscuridad (=activa) del día. El área de comida de la jaula se excluyó. (D) La rapamicina con recubrimiento entérico mantiene hematocritos normales en ratones *Apc^{Min/+}*. Tenga en cuenta la respuesta a la dosis. También tenga en cuenta el hematocrito normal en comparación con los ratones C57BL/6 de tipo salvaje (~ 40 %) en el grupo de dosis alta incluso en momentos tardíos en los que muchos ratones C57BL/6 de tipo salvaje morirían por causas naturales. (E) Rapamicina con recubrimiento entérico en comparación con RAD001 (everolimus). Curvas de supervivencia tomadas de Fujishita y otros, 2008, mediante el uso de RAD001 administrado por sonda en las dosis indicadas debajo del gráfico. La supervivencia de tipo salvaje se muestra en (A). Tenga en cuenta que la dosis más baja de rapamicina con recubrimiento entérico extiende la supervivencia mejor que la dosis más alta de RAD001 y la dosis más alta supera con creces a RAD001 en la extensión de la vida útil.

Las Figuras 10A-10H ilustran los datos farmacodinámicos para ratones C57BL/6 alimentados con rapamicina con recubrimiento entérico. (A) Las transferencias de Western se desarrollaron con los anticuerpos indicados. Se alimentaron ratones C57BL/6 (607-627 días de edad) con rapamicina con recubrimiento entérico durante 42 días, se diseccionó el intestino y se sometió a inmunoensayo. Se analizaron los segmentos del intestino delgado (proximal y distal) como se indica. Los gráficos muestran la cuantificación de los datos de inmunotransferencia medidos por la relación de valores de intensidad para la señal dependiente del estado de fosforilación (P(240/244)rpS6) y la señal

independiente del estado de fosforilación (rpS6) (B) y la señal de rpS6 y la señal del anticuerpo de actina (C). (D) Niveles de rapamicina en sangre de ratones C57BL/6 a los 607-627 días de edad (42 días con dietas de rapamicina con recubrimiento entérico, que promediaron 37 ng/ml y 170 ng/ml para los grupos a 14 y 42 ppm, respectivamente). (E) Niveles de rapamicina en el tejido del intestino delgado proximal y distal de ratones C57BL/6 (607-627 días de edad y 42 días con dieta). Los niveles medios ($\mu\text{g/g}$) son: proximal con 14 ppm $91,62 \pm 14,91$, 42 ppm $266,7 \pm 26,35$; distal con 14 ppm $627,3 \pm 135,5$, 42 ppm $1488 \pm 141,6$. Los valores de P son: 0,001 (proximal con 14 ppm en comparación con 42 ppm); 0,035 (distal con 14 ppm en comparación con 42 ppm); 0,0077 (proximal con 14 ppm en comparación con 42 ppm); <0,0001 (proximal con 42 ppm en comparación con distal con 42 ppm). (F) Niveles de rapamicina en sangre en ratones *Apc^{Min/+}* a los 217 días (174 días con dietas de rapamicina con recubrimiento entérico, que promediaron 14 ng/ml o 26,6 ng/ml en dietas de 14 ppm, respectivamente) o a los 308 días de edad (265 días con una dieta de rapamicina con recubrimiento entérico, que promedió 10,2 ng/ml o 28,1 ng/ml en dietas de 14 ppm o 42 ppm, respectivamente). (G&H) Gráficos que muestran la cuantificación de la señal dependiente del estado de fosforilación P(Ser473)Akt y la señal independiente del estado de fosforilación (D) y la señal de Akt y del anticuerpo de actina (E). Tenga en cuenta que el tratamiento crónico con rapamicina con recubrimiento entérico no conduce a la activación de rebote de Akt.

La Figura 11 ilustra los datos que respaldan que la rapamicina con recubrimiento entérico reprime mTORC1 en el colon. Las inmunotransferencias desarrolladas con los anticuerpos mostrados indican una fuerte reducción en la fosforilación de Ser240/244 de rpS6 en relación con el colon sin tratar. Tenga en cuenta que los niveles de rpS6 no parecen cambiar. Los niveles de rapamicina en sangre se indican debajo de cada carril, lo que representa un colon de un ratón C57BU6 que consume comida con o sin rapamicina con recubrimiento entérico como se muestra en los carriles. Tenga en cuenta también que la movilidad más baja, la banda menos fosforilada (α) de 4E-BP1, aumenta con el tratamiento con rapamicina con recubrimiento entérico. El anticuerpo 4E-BP1 es independiente del estado de fosforilación y, por lo tanto, detecta las tres formas de movilidad de 4E-BP1 indicadas. Estos datos sugieren que las dos salidas principales (4E-BP1 y S6K1 rpS6) de mTORC1 están reprimidas en el colon por el tratamiento crónico.

La Figura 12 ilustra los datos que respaldan que la rapamicina encapsulada mejora la memoria y restaura el flujo sanguíneo cerebral (CBF) en ratones con AD tratados con rapamicina después del inicio de la enfermedad. a, Aprendizaje espacial. Si bien el aprendizaje en ratones con AD se vio afectado, $P < 0,001$ y $P < 0,01$, la prueba post hoc de Bonferroni se aplicó a un efecto significativo del genotipo y el tratamiento, $F(3188)=6,04$, $P=0,0014$, medidas repetidas (RM) ANOVA de 2 vías], el rendimiento de los ratones con AD alimentados con rapamicina fue indistinguible del de los compañeros de camada sin Tg y de los ratones con AD alimentados con control. No se observó una interacción significativa entre el número de días y el genotipo ($P=0,96$), por lo que el genotipo y el tratamiento tuvieron el mismo efecto en todo momento durante el entrenamiento. El aprendizaje general fue eficaz en todos los grupos [$F(4,188)=3,36$, $P=0,01$, RM ANOVA bidireccional]. b, La memoria espacial se restaura mediante el tratamiento con rapamicina. Mientras que la memoria en los ratones con AD alimentados con control se deterioró [valores de P como se indica, la prueba de Tukey se aplicó a un efecto significativo del genotipo y el tratamiento ($P < 0,0001$), ANOVA de una vía], la memoria en los ratones con AD alimentados con rapamicina fue indistinguible de la de los grupos sin Tg y mejoró significativamente en comparación con los ratones con AD alimentados con control ($P=0,03$). c-g, La rapamicina restaura el CBF en ratones con AD. c, Mapas de CBF y mapas de CBF regionales (e) de ratones con AD y sin Tg tratados con rapamicina y control representativos obtenidos mediante MRI. d, Las disminuciones en el CBF en ratones con AD se anulan mediante el tratamiento con rapamicina (P como se indica, prueba de Bonferroni sobre un efecto significativo del genotipo y el tratamiento en CBF, $F(1,16)=14,54$, $P=0,0015$, ANOVA bidireccional). f y g, Hipocampo disminuido (f) pero no talámico (g) el CBF en ratones con AD se restaura mediante el tratamiento con rapamicina (P como se indica, prueba de Bonferroni sobre un efecto significativo del tratamiento en el CBF, $F(1,16)=13,62$, $P=0,0020$, ANOVA bidireccional). Los datos son medias $\pm$ SEM. Paneles a-b, $n=10-17$ por grupo. Paneles c-g, $n=6$ por grupo.

Las Figuras 13A-13D ilustra los datos que indican un aumento de la densidad vascular sin cambios en el metabolismo de la glucosa en ratones con AD tratados con rapamicina. A, Mapas de tasa metabólica cerebral de glucosa (CMR_{glc}) de ratones con Tg y AD y sin Tg tratados con rapamicina y control representativos obtenidos mediante tomografía por emisión de positrones. b, CMR_{glc} como los valores de captación estandarizados (SUV) para la región de interés no fueron diferentes entre los grupos experimentales ($F(1,20)=0,77$, $P=0,39$ para el efecto del genotipo y $F(1,20)=3,63$, $P=0,071$ para el efecto del tratamiento, ANOVA bidireccional). c, Imágenes de angiografía por resonancia magnética de cerebros de ratones con AD y sin Tg tratados con rapamicina. Las regiones representativas que muestran la pérdida de vasculatura en ratones con AD tratados con control y su restauración en animales tratados con rapamicina se indican con flechas. d, La disminución de la densidad de los vasos cerebrales en ratones con AD tratados con control se anula mediante el tratamiento con rapamicina (P como se indica, la prueba post hoc de Bonferroni aplicada a un efecto significativo del tratamiento sobre la densidad vascular, $F(1,16)=24,47$, $P=0,0001$, ANOVA bidireccional). Los datos son medias $\pm$ SEM. $n=6$ por grupo.

La Figura 14 ilustra los niveles de rapamicina en diferentes regiones del cerebro de ratones con AD alimentados crónicamente con comida suplementada con rapamicina.

Descripción detallada de modalidades preferidas

La invención se define en las reivindicaciones. Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que se cree que las técnicas descritas en estos ejemplos representan técnicas que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, a la luz de la presente descripción, los expertos en la técnica deberían apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las modalidades específicas que se describen mientras se obtiene un resultado similar o igual sin apartarse del alcance de la invención.

Para los fines de estas descripciones, algunas simplificaciones de redacción también deben entenderse como universales, excepto en la medida en que se aclare lo contrario en un contexto particular, ya sea en la especificación o en cualquiera de las reivindicaciones. El uso del término "o" en la especificación se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse únicamente a alternativas, o a menos que las alternativas sean inherentemente mutuamente excluyentes. Cuando se hace referencia a valores, el término "aproximadamente" se usa para indicar un valor aproximado, generalmente uno que incluye la desviación estándar del error para cualquier modalidad particular que se describe o que se use comúnmente para determinar dicho valor. "Uno" o "una" pueden significar uno o más, a menos que se indique claramente lo contrario. Tales significados de "uno o más" están especialmente pensados cuando las referencias se hacen junto con palabras abiertas tales como "tener", "comprender" o "incluir". Asimismo, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

En modalidades particulares, la rapamicina se administra preferentemente por vía oral en la forma de una preparación de rapamicina con recubrimiento entérico y/o e-nanoRapa.

La rapamicina se une a un miembro de la familia de proteínas de unión a FK (FKBP), FKBP 12. El complejo rapamicina/FKBP 12 se une a la proteína quinasa mTOR para bloquear la actividad de las vías de transducción de señales. Debido a que la red de señalización de mTOR incluye múltiples genes supresores de tumores, que incluyen PTEN, LKB1, TSC1 y TSC2, y múltiples protooncogenes, que incluyen P13K, Akt y eEF4E, la señalización de mTOR juega un papel central en la supervivencia y la proliferación celular. La unión del complejo rapamicina/FKBP a mTOR provoca la detención del ciclo celular en la fase G1 (Janus 2005).

En aspectos de la descripción, los inhibidores de mTORC1 incluyen análogos de rapamicina. Se conocen en la técnica muchos análogos de rapamicina. Los ejemplos no limitantes de análogos de rapamicina incluyen, pero no se limitan a, everolimus, tacrolimus, CC1-779, ABT-578, AP-23675, AP-23573, AP-23841, 7-epi-rapamicina, 7-tiometil-rapamicina, 7-epi-trimetoxifenil-rapamicina, 7-epi-tiometil-rapamicina, 7-demetoxirapamicina, 32-emetoxi-rapamicina, 2-desmetil-rapamicina y 42-O-(2-hidroxietil)etil rapamicina.

En aspectos de la descripción, otros análogos de rapamicina incluyen: oximas de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,446,048); aminoésteres de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,130,307); dialdehídos de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 6,680,330); 29-enoles de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 6,677,357); derivados de rapamicina O-alkilada (Patente de Estados Unidos núm. 6,440,990); ésteres de rapamicina soluble en agua (Patente de Estados Unidos núm. 5,955,457); derivados de rapamicina alquilada (Patente de Estados Unidos núm. 5,922,730); amidino carbamatos de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,637,590); ésteres de biotina de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,504,091); carbamatos de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,567,709); hidroxiésteres de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,362,718); 42-sulfonatos y 42-(N-carbaloxi)sulfamatos de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,346,893); isómeros oxepano de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,344,833); derivados de imidazolidil rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,310,903); alcoxiésteres de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,233,036); pirazoles de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,164,399); derivados acilo de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 4,316,885); productos de reducción de rapamicina (Patentes de Estados Unidos núms. 5,102,876 y 5,138,051); ésteres amida de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,118,677); ésteres fluorados de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,100,883); acetales de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,151,413); oxorapamicinas (Patente de Estados Unidos núm. 6,399,625); y silil ésteres de rapamicina (Patente de Estados Unidos núm. 5,120,842).

En aspectos de la descripción, otros análogos de rapamicina incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,015,809; 6,004,973; 5,985,890; 5,955,457; 5,922,730; 5,912,253; 5,780,462; 5,665,772; 5,637,590; 5,567,709; 5,563,145; 5,559,122; 5,559,120; 5,559,119; 5,559,112; 5,550,133; 5,541,192; 5,541,191; 5,532,355; 5,530,121; 5,530,007; 5,525,610; 5,521,194; 5,519,031; 5,516,780; 5,508,399; 5,508,290; 5,508,286; 5,508,285; 5,504,291; 5,504,204; 5,491,231; 5,489,680; 5,489,595; 5,488,054; 5,486,524; 5,486,523; 5,486,522; 5,484,791; 5,484,790; 5,480,989; 5,480,988; 5,463,048; 5,446,048; 5,434,260; 5,411,967; 5,391,730; 5,389,639; 5,385,910; 5,385,909; 5,385,908; 5,378,836; 5,378,696; 5,373,014; 5,362,718; 5,358,944; 5,346,893; 5,344,833; 5,302,584; 5,262,424; 5,262,423; 5,260,300; 5,260,299; 5,233,036; 5,221,740; 5,221,670; 5,202,332; 5,194,447; 5,177,203; 5,169,851; 5,164,399; 5,162,333; 5,151,413; 5,138,051; 5,130,307; 5,120,842; 5,120,727; 5,120,726; 5,120,725; 5,118,678; 5,118,677; 5,100,883; 5,023,264; 5,023,263; 5,023,262. Pueden encontrarse análogos y derivados de rapamicina adicionales en las siguientes publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos Núms.: 20080249123, 20080188511; 20080182867; 20080091008; 20080085880; 20080069797; 20070280992; 20070225313; 20070203172; 20070203171; 20070203170; 20070203169; 20070203168; 20070142423; 20060264453; y 20040010002.

La rapamicina puede obtenerse de cualquier fuente conocida por los expertos en la técnica. La fuente puede ser una fuente comercial o una fuente natural. La rapamicina puede sintetizarse químicamente mediante el uso de cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos no limitantes de información sobre la síntesis de rapamicina en Schwecke y otros, 1995; Gregory y otros, 2004; Gregory y otros, 2006; Graziani, 2009.

Las modalidades preferidas de la presente invención proporcionan una forma mejorada de rapamicina encapsulada, una nanopartícula de rapamicina encapsulada que es más duradera, estable y biodisponible, que mejora la eficacia y la previsibilidad y asegura una mejor biodistribución al tiempo que permite un mejor cumplimiento del paciente en relación con la rapamicina cruda, así como también se produce a un costo razonable. La forma mejorada de rapamicina encapsulada preferentemente proporciona las nanopartículas de rapamicina dentro de una matriz de polímero, que forma una nanopartícula de rapamicina encapsulada en una estructura única de administración de fármaco para la administración oral de la rapamicina. La matriz de polímero, más particularmente, es una matriz de liberación controlada, como se describe en otra parte de estas descripciones. Esta nanopartícula de rapamicina encapsulada también puede denominarse nanopartícula de rapamicina con recubrimiento entérico. Además, muchas de las modalidades preferidas también incluyen un compuesto estabilizador (para nuestros propósitos, un "estabilizador") dentro de la matriz de liberación controlada, ya sea para mejorar la compatibilidad de la rapamicina con la matriz de liberación controlada, para estabilizar la morfología cristalina de la rapamicina, o para ayudar a prevenir aún más la degradación de la rapamicina, particularmente cuando la nanopartícula de rapamicina encapsulada se expone al aire, la humedad atmosférica o la temperatura ambiente o condiciones más cálidas. Las modalidades particularmente preferidas incorporan los estabilizadores dentro de cada nanopartícula de rapamicina, aunque determinados aspectos de la invención pueden realizarse con estabilizadores en la superficie de las nanopartículas de rapamicina encapsulada o dispersarse de otro modo en la matriz de liberación controlada. A diferentes niveles dependiendo del enfoque particular usado para producir las nanopartículas, con o sin otros aditivos, el resultado es más eficaz para el tratamiento y la prevención de trastornos genéticamente predispuestos y trastornos relacionados con la edad, especialmente en los campos de la oncología y la neurología en humanos y otros animales.

La precipitación rápida antidisolvente, o precipitación controlada, es un método preferido para preparar las nanopartículas de rapamicina, ya que proporciona una manipulación mínima de la rapamicina y un control exquisito sobre el tamaño y la distribución de las nanopartículas y la cristalinidad de la rapamicina. Se conocen en la técnica varios métodos de precipitación controlada, que incluyen el intercambio rápido de disolventes y la expansión rápida de soluciones supercríticas, las cuales pueden implementarse en modo discontinuo o continuo, son escalables y adecuadas para manipular compuestos farmacéuticos. Las modalidades preferidas usan un enfoque aniónico, que produce micelas 130 (ilustradas en la Figura 1) u otras agregaciones moleculares de compuestos anfipáticos (por ejemplo, colato de sodio o tensoactivos similares con tendencias anfipáticas) en concentraciones mayores que sus concentraciones micelares críticas.

Como parte de un proceso preferido para producir las nanopartículas de rapamicina microencapsulada, las Figuras 1 y 2 ilustran las etapas preferidas para producir una dispersión de nanopartículas de rapamicina preferidas mediante una precipitación controlada. La propia rapamicina (a veces denominada rapamicina "cruda" o "pura") está disponible en forma de polvo a partir de múltiples fuentes fácilmente identificables para aquellos en el campo. Aunque la rapamicina no es fácilmente soluble en agua, puede lograrse la solubilidad en algunos disolventes miscibles en agua.

La etapa 1 en la Figura 2 ilustra una primera etapa básica en el proceso preferido de producir nanopartículas de rapamicina preferidas, mediante el cual se mezcla la rapamicina cruda y se disuelve en un disolvente miscible en agua 160 (la mezcla representada por 140 en la Figura 1). Como se ilustra en la Etapa 2 en la Figura 2, la mezcla de disolvente resultante se inyecta en agua rápidamente agitada que contiene un dispersante soluble en agua apropiado, preferentemente colato de sodio, que es una molécula anfipática polar que tiende a formar micelas a partir de la solución.

Después de mezclar la mezcla de disolvente con el dispersante acuoso productor de micelas en la Etapa 2, los efectos de la solubilidad hacen que la rapamicina se reparta en los núcleos de micelas hidrófobos 130. Los disolventes 160 y los dispersantes 110 apropiados se comentan con mayor detalle a continuación. Aunque el núcleo de las micelas es relativamente hidrófobo, lo que tiende a atraer la rapamicina de la mezcla de disolventes, los resultados generan una nanopartícula 150 que tiene una superficie exterior decorada con extremos hidrófilos de colato de sodio, que tienden a mantener las nanopartículas resultantes en suspensión dentro de la mezcla final.

En la fotografía de la Figura 3 se muestra una muestra de una dispersión de nanopartículas de rapamicina resultante de la Etapa 2. La Figura 3 también muestra un gráfico representativo de la distribución de tamaño de nanopartículas de rapamicina resultante, como lo indica la intensidad de la luz dispersada por los tamaños de partículas correspondientes dentro de la dispersión de la muestra. El colato de sodio da como resultado una superficie hidrófila, que estabiliza las nanopartículas en el medio acuoso y evita de este modo la agregación y el crecimiento de partículas. Este producto asegura una estabilidad mejorada y prolongada de la rapamicina, es decir,

una resistencia mejorada a la degradación por humedad y/u oxidación del producto final, así como también buenas características de bioabsorción intestinal para la rapamicina protegida de esta manera.

Las nanopartículas de rapamicina preparadas mediante métodos de precipitación controlada pueden estabilizarse contra la agregación irreversible, la maduración de Ostwald y/o la dispersabilidad reducida, mediante el control de la química coloidal, la química de la superficie de las partículas y la morfología de las partículas. Por ejemplo, las nanopartículas preparadas mediante la solidificación con antidisolvente pueden estabilizarse mediante tensoactivos iónicos y no iónicos que se adsorben en las superficies de las nanopartículas y promueven la estabilidad coloidal de las partículas mediante la repulsión de carga o el impedimento estérico, respectivamente. Además, los estabilizadores pueden afectar la cristalinidad de las nanopartículas, lo que puede preferirse para promover una biodistribución y biodisponibilidad diferentes en determinadas indicaciones.

Las nanopartículas de rapamicina pueden consistir en la rapamicina molecular unida mediante métodos adecuados a otras nanopartículas. Los métodos adecuados para unir la rapamicina a un portador o sustrato de nanopartículas pueden incluir la adsorción física a través de fuerzas de hidrógeno de van der Waals o la quimisorción a través de enlaces covalentes o iónicos. Los sustratos de nanopartículas pueden ser naturales o sintéticos, y modificados para promover las interacciones específicas con la rapamicina. Las nanopartículas naturales incluyen la albúmina y otras proteínas, y el ADN. Las nanopartículas sintéticas incluyen partículas orgánicas e inorgánicas, micelas, liposomas, dendrímeros, polímeros hiperramificados y otros compuestos.

Las nanopartículas de rapamicina pueden procesarse mediante cualquier método adecuado, tales como la molienda, la atomización a alta presión o la precipitación rápida antidisolvente. La molienda es adecuada siempre que se tenga cuidado de minimizar tanto la degradación de la rapamicina como la aglomeración de partículas. La degradación de la rapamicina puede reducirse con la ayuda de procesos de enfriamiento o criogénicos. La aglomeración debida al área de superficie aumentada y las fuerzas adhesivas concomitantes puede reducirse mediante el uso de dispersantes 110 durante el proceso de molienda.

Las nanopartículas de rapamicina individuales tienen preferentemente un tamaño en el intervalo entre aproximadamente 1 nanómetro y aproximadamente 1 micra. Se prefieren las nanopartículas de rapamicina de tamaño más pequeño, preferentemente de menos de 1 micra de diámetro, por varias razones, que incluyen un mejor control del tamaño de partícula final, una estabilidad mejorada dentro de las partículas y la capacidad de ajustar la biodisponibilidad mediante el control de la cristalinidad y la composición de las nanopartículas de rapamicina.

Los enfoques de fabricación para las modalidades de la estructura de administración de fármaco de nanopartículas de rapamicina encapsulada de la presente invención incluyen generar una solución de la matriz de liberación controlada, con las nanopartículas de rapamicina dispersas en la misma, en la proporción apropiada y producir una mezcla heterogénea. El disolvente para tales mezclas puede ser un disolvente volátil adecuado para la matriz de liberación controlada, aunque se prefiere que el disolvente sea un disolvente pobre o no disolvente para las nanopartículas de rapamicina de modo que cuando las nanopartículas de rapamicina se dispersen en la solución de la matriz de liberación controlada permanecen como nanopartículas discretas. La dispersión resultante de nanopartículas de rapamicina en la solución de la matriz de liberación controlada puede reducirse a un polvo seco en partículas mediante un proceso adecuado, dando como resultado micropartículas de naturaleza heterogénea compuestas por nanopartículas de rapamicina distribuidas aleatoriamente en la matriz de liberación controlada. El polvo en partículas también puede adaptarse mediante un proceso adecuado para lograr un tamaño de partícula preferido para la preparación posterior, que puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 micras de diámetro.

Las nanopartículas de rapamicina se microencapsulan con la matriz de liberación controlada mediante el uso de un proceso de formación de partículas adecuado para formar la nanopartícula de rapamicina encapsulada. Un ejemplo de un proceso de formación de partículas es la atomización y el secado con discos giratorios. Para una discusión detallada del aparato y el método en relación con el proceso de recubrimiento con disco giratorio antes mencionado, esta solicitud se refiere a las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 2011/221337 y 2011/220430, respectivamente. Alternativamente, por ejemplo, las nanopartículas de rapamicina encapsulada pueden prepararse mediante secado por pulverización.

En algunas modalidades, no todas las nanopartículas de rapamicina estarán encapsuladas dentro de la matriz de liberación controlada. En cambio, las nanopartículas de rapamicina pueden estar entrelazadas con la matriz de liberación controlada, con algunas de las nanopartículas de rapamicina totalmente contenidas dentro de la matriz de liberación controlada, mientras que otras nanopartículas de rapamicina son aparentes en la superficie de la estructura de administración de fármaco, construidas en apariencia similar a una galleta con chispas de chocolate.

En dependencia del tamaño de las nanopartículas de rapamicina, las nanopartículas de rapamicina encapsulada tienen preferentemente un diámetro de entre 10 y 50 micras, aunque diámetros tan grandes como 75 micras pueden ser adecuados para alternativas con los correspondientes compromisos debido al mayor tamaño.

La matriz de liberación controlada de las nanopartículas de rapamicina encapsulada puede seleccionarse para proporcionar las características de liberación preferidas de las nanopartículas de rapamicina encapsulada. Por ejemplo, la matriz puede ser sensible al pH para proporcionar la liberación gástrica o, preferentemente, la liberación entérica de la rapamicina. Se prefiere la liberación entérica de la rapamicina para lograr una mejor absorción y biodisponibilidad de la rapamicina. Se conocen en la técnica muchos materiales adecuados para la liberación entérica, que incluyen ácidos grasos, ceras, polímeros naturales y sintéticos, goma laca y otros materiales. Los polímeros son un recubrimiento entérico preferido y pueden incluir copolímeros de ácido metacrílico y metacrilato de metilo, copolímeros de acrilato de metilo y ácido metacrílico, alginato de sodio, acetato ftalato de polivinilo y diversos succinatos o derivados ftalatos de celulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Los polímeros sintéticos, tales como los copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de metilo o metacrilato de metilo, son polímeros de liberación entérica preferidos debido a la capacidad de ajustar el intervalo de pH de la disolución de estos polímeros sintéticos mediante el ajuste de sus composiciones de comonomero. Ejemplos de tales polímeros sensibles al pH son los polímeros EUDRAGIT® (Evonik Industries, Essen, Alemania). Específicamente, EUDRAGIT® S 100, un copolímero de metacrilato de metilo y ácido metacrílico con una relación de comonomero de 2:1, respectivamente, tiene un pH de la disolución de aproximadamente 7,0, lo que lo hace adecuado para la liberación entérica de la rapamicina.

Las nanopartículas de rapamicina encapsulada pueden administrarse en diversas entidades físicas, que incluyen una píldora, comprimido o cápsula. Las nanopartículas de rapamicina encapsulada pueden comprimirse o formarse en forma de gránulos y encapsularse adicionalmente con un recubrimiento, por ejemplo, un recubrimiento de nanopartículas de rapamicina encapsulada. En otra modalidad, las nanopartículas de rapamicina encapsulada pueden cargarse en una cápsula, también recubierta entéricamente adicionalmente.

Pueden añadirse varios aditivos que mejoran el rendimiento a las nanopartículas de rapamicina encapsulada. Por ejemplo, pueden añadirse aditivos que funcionan como captadores de radicales libres o estabilizadores para mejorar la estabilidad oxidativa y de almacenamiento de las nanopartículas de rapamicina encapsulada. Los captadores de radicales libres se eligen preferentemente del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol y otros alcoholes inferiores. Los aditivos incorporan alternativamente antioxidantes, tales como α -tocoferol (vitamina E), ácido cítrico, EDTA, ácido α -lipoico o similares.

Los copolímeros de ácido metacrílico con acrilato de metilo o metacrilato de metilo son barreras moderadas al oxígeno. Además, estos polímeros exhibirán un contenido de humedad en equilibrio. El transporte de oxígeno debido al disolvente residual, la humedad u otras causas, puede conducir a la degradación de las nanopartículas de rapamicina encapsulada. Pueden añadirse materiales de barrera al oxígeno a la formulación de nanopartículas de rapamicina encapsulada para mejorar las propiedades de barrera al oxígeno. Los polímeros de barrera al oxígeno preferidos, compatibles con los polímeros preferidos son el alcohol polivinílico (PVA) y la gelatina.

Modalidades preferidas de micropartículas y nanopartículas

Las modalidades preferidas con inclusiones de nanopartículas de rapamicina comprenden nanopartículas discretas de rapamicina dispersas heterogéneamente en una matriz de liberación controlada. Como se ilustra en los dibujos adjuntos, las nanopartículas de rapamicina se preparan mediante un método adecuado y pueden contener aditivos para promover la estabilidad de las nanopartículas, modificar la cristalinidad de la rapamicina o promover la compatibilidad de las nanopartículas de rapamicina con la matriz de liberación controlada. La matriz de liberación controlada está formulada para promover la liberación de rapamicina a partes específicas del cuerpo, tales como el intestino, para mejorar la estabilidad oxidativa y de almacenamiento de las nanopartículas de rapamicina encapsulada y para mantener la naturaleza discreta y heterogéneamente distribuida de las nanopartículas de rapamicina.

Las nanopartículas de rapamicina se preparan preferentemente mediante precipitación o solidificación antidisolvente, también denominada a veces precipitación o solidificación controlada. La solidificación antidisolvente es un enfoque preferido ya que proporciona un control exquisito del tamaño y distribución de las partículas, la morfología de las partículas y la cristalinidad de la rapamicina. Por ejemplo, es posible preparar nanopartículas con una distribución de tamaño de partícula estrecha que sean amorfas, cristalinas o las combinaciones de estas. Tales propiedades pueden exhibir beneficios adicionales al controlar adicionalmente la biodistribución y la biodisponibilidad de la rapamicina en indicaciones específicas.

La rapamicina se disuelve en un disolvente miscible en agua 160 adecuado y luego se inyecta rápidamente en agua rápidamente agitada que contiene un dispersante soluble en agua 110 apropiado. Los disolventes miscibles en agua 160 para la rapamicina incluyen metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, n-metilpirrolidona, tetrahidrofurano y otros disolventes. Se prefieren los disolventes miscibles en agua 160 a alta presión de vapor y bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación durante la formación posterior de micropartículas. Algunos disolventes miscibles en agua 160 preferidos son metanol, acetona y alcohol isopropílico. Un disolvente miscible en agua 160 preferido es el metanol. Algunos dispersantes solubles en agua 110 incluyen tensoactivos iónicos tales como dodecilsulfato de sodio y colato de sodio, tensoactivos no iónicos tales como Pluronics, Poloxomeros, Tweens y polímeros, tales como alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Algunos dispersantes solubles en agua 110 preferidos son colato de sodio, Pluronic F-68 y Pluronic F-127. Un dispersante

soluble en agua 110 preferido es el colato de sodio, que proporciona propiedades sorprendentemente beneficiosas en la presente solicitud.

El colato de sodio no solo es un tensoactivo y un dispersante, sino que también sirve para producir estructuras multimoleculares que tienden a provocar la agregación de la rapamicina dentro de esas estructuras, particularmente cuando el pH y otras condiciones de la solución acuosa se controlan para permitir la agregación de la rapamicina a partir de esa solución acuosa. El proceso resultante permite la producción de nanopartículas de rapamicina que no solo tienden a producir nanopartículas en intervalos de tamaño altamente predecibles, sino que también proporciona una nanopartícula resultante con niveles sorprendentemente deseables de estabilidad coloidal. Además, aunque el colato de sodio tiende a ser una molécula polar así como también un tensoactivo anfótero, induce una carga iónica en cada nanopartícula hidrófila cuando se entrelaza en la matriz EUDRAGIT®. Se cree que cuando la nanopartícula se libera de la matriz EUDRAGIT® dentro de los conductos entéricos del sujeto animal donde las condiciones son básicas, las mismas propiedades provocan que la nanopartícula se reciba y absorba más fácilmente a través de las paredes intestinales.

La rapamicina se disuelve en el disolvente miscible en agua 160 a una concentración de aproximadamente 0,01 % p/v a aproximadamente 10,0 % p/v, preferentemente de aproximadamente 0,1 % p/v a aproximadamente 1,0 % p/v. El dispersante soluble en agua 110 se disuelve en agua a una concentración por encima de su concentración micelar crítica, o CMC, típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces la CMC. La solución de rapamicina se inyecta en la solución dispersante soluble en agua con agitación en una relación volumétrica de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1, preferentemente de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:1.

La matriz de liberación controlada se prepara a partir de un polímero soluble en agua, preferentemente un copolímero de ácido metacrílico con acrilato de metilo o metacrilato de metilo, tales como los comercializados con el nombre comercial de EUDRAGIT® y que tienen propiedades de disolución dependientes del pH. Con mayor preferencia, la matriz de liberación controlada está compuesta de EUDRAGIT® S 100, aunque sería adecuada otra liberación controlada entérica soluble en agua. Las matrices de liberación controlada solubles en agua se seleccionan para no comprometer la integridad de las nanopartículas de rapamicina o para proporcionar un medio en el que las nanopartículas de rapamicina pueden prepararse mediante la metodología de precipitación controlada descrita anteriormente.

Al preparar el polímero soluble en agua, es preferible mantener condiciones que no comprometan la integridad de las nanopartículas de rapamicina. En primer lugar, dado que las nanopartículas de rapamicina son susceptibles de solubilización por determinados codisolventes, es importante mantener una cantidad adecuada de determinados codisolventes para lograr la solubilidad de la matriz de liberación controlada sin afectar negativamente la morfología de las nanopartículas de rapamicina. En segundo lugar, las nanopartículas de rapamicina serán susceptibles a la degradación química por un pH elevado; por lo tanto, es importante modular el pH de la solución de la matriz de liberación controlada para que la rapamicina no se altere químicamente. Es preferible que el pH de la solución de la matriz de liberación controlada se mantenga por debajo de aproximadamente 8. Por último, es preferible conseguir una solubilización casi completa de la matriz de liberación controlada en la solución de modo que la microencapsulación de las nanopartículas de rapamicina por la matriz de liberación controlada en las etapas de procesamiento posteriores pueda proceder con alta eficacia. Cuando se usa EUDRAGIT® S 100 como matriz de liberación controlada, es preferible lograr una solución de la matriz de liberación controlada mediante el uso de una combinación de codisolventes y la modulación del pH de la solución. Es preferible que los codisolventes sean aproximadamente el 40 % o menos en volumen. De manera similar, es preferible que el pH de la solución de la matriz de liberación controlada sea de aproximadamente 8 o menos, de modo que el EUDRAGIT® S 100 no esté completamente neutralizado y preferentemente solo esté neutralizado aproximadamente en un 80 % o menos. Estas condiciones preferidas logran una solubilización de casi completa a completa del EUDRAGIT® S 100 en un medio que es principalmente acuoso y que mantiene la integridad de las nanopartículas de rapamicina, lo que conduce a su microencapsulación por la matriz de liberación controlada en las etapas de procesamiento posteriores.

Las nanopartículas de rapamicina preparadas mediante el método de precipitación controlada preferido se añaden a la solución acuosa de la matriz de liberación controlada, lo que da como resultado una dispersión de nanopartículas en la matriz de liberación controlada solubilizada. Alternativamente, la rapamicina solubilizada en un codisolvente adecuado o preferido puede dispersarse en la solución acuosa de la matriz de liberación controlada, lo que conduce a la precipitación controlada de las partículas de rapamicina, lo que conduce de este modo a una dispersión de nanopartículas de rapamicina en menos etapas de procesamiento, pero con una composición adecuada para permitir el posterior procesamiento de microencapsulación.

Como un aspecto alternativo de la descripción, las nanopartículas de rapamicina encapsulada se generan mediante el uso de sustratos de nanopartículas preexistentes, tales como la albúmina, para generar, en el caso de la albúmina, "nanopartículas de albúmina-rapamicina". Dentro de esta clase general de alternativas, los enfoques preferidos para generar las nanopartículas de albúmina-rapamicina implican encapsular la rapamicina dentro de las nanopartículas de albúmina o asociar preferentemente la rapamicina con las nanopartículas de albúmina mediante

adsorción física o química. Las propias nanopartículas de albúmina se forman preferentemente a partir de albúmina de suero humano, una proteína plasmática derivada del suero humano.

Más particularmente, este aspecto implica preferentemente el uso de un péptido o proteína terapéutica que se une covalente o físicamente a la albúmina, para mejorar su estabilidad y vida media. Con la albúmina estabilizada, la rapamicina se mezcla con la albúmina estabilizada en un disolvente acuoso y se pasa a alta presión para formar las nanopartículas de rapamicina-albúmina en el intervalo de tamaño de 100-200 nm (comparable al tamaño de los liposomas pequeños).

Los aspectos preferidos también abordan los riesgos de la degradación y otros límites impuestos por la técnica relacionada mediante la preparación de nanopartículas de rapamicina encapsulada como una mezcla heterogénea de nanopartículas de rapamicina en una matriz de polímero. Las nanopartículas distribuidas son morfológicamente diferentes a la rapamicina homogénea y son menos susceptibles a la degradación debido a la naturaleza a granel de las nanopartículas en comparación con el tamaño más pequeño de la rapamicina molecular.

Otro aspecto alternativo de la descripción implica los polímeros biodegradables cargados con rapamicina. Los polímeros biodegradables cargados con fármacos pueden ser micropartículas. "Micropartícula" se refiere a partículas entre aproximadamente 0,1 y 300 μm de tamaño. Los polímeros biodegradables cargados con fármaco liberan el fármaco de forma dependiente del tiempo.

Como se usa en la presente descripción, "biodegradable" se refiere a cualquier medio natural por el cual un polímero puede desecharse en el cuerpo de un paciente. Esto incluye fenómenos tales como, sin limitación, descomposición biológica, bioerosión, absorción, reabsorción, etc. La biodegradación de un polímero *in vivo* resulta de la acción de uno o más agentes biológicos endógenos y/o condiciones tales como, sin limitación, enzimas, microbios, componentes celulares, pH fisiológico, temperatura y similares.

En algunos aspectos, los polímeros biodegradables pueden ser micropartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL). La PCL es un polímero biodegradable, biocompatible y semicristalino. La PCL es útil para la administración de fármacos porque es muy permeable a muchos fármacos y no es tóxica. Sinha y otros, 2004. La rapamicina también puede cargarse en micropartículas de otros polímeros biodegradables, que incluyen, pero no se limitan a, poliéster alifático, polilactida, poliglicólido, poli(lactida-co-glicólido), las mezclas de estos y sus copolímeros. Tales polímeros biodegradables se conocen en la técnica.

La rapamicina puede cargarse en microesferas de PCL sola o de copolímeros o mezclas de PCL para obtener las características de liberación del fármaco deseadas. Los copolímeros de PCL pueden formarse mediante el uso de muchos monómeros diferentes, que incluyen, pero no se limitan a, óxido de etileno, cloruro de polivinilo, cloropreno, polietilenglicol, poliestireno, diisocianatos (uretanos), tetrahidrofurano (THF), diglicólido, dilactida, δ -valeractona, caprolactonas sustituidas, 4-vinil anisol, estireno, metacrilato de metilo y acetato de vinilo.

Las microesferas de PCL cargadas con fármaco pueden prepararse mediante varios métodos diferentes conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, un método de extracción/evaporación del disolvente de emulsión aceite/agua, una técnica de evaporación del disolvente de emulsión agua/aceite/agua, una técnica de secado por pulverización, un método de dispersión mejorada en solución y una técnica de fusión en caliente. Estos métodos se describen con más detalle en Sinha y otros, 2004. Brevemente, como un ejemplo no limitante, el método de evaporación extracción del disolvente de emulsión aceite/agua puede realizarse al disolver la cantidad requerida de polímero y fármaco en una fase orgánica, emulsionar bajo agitación con alcohol polivinílico para formar una emulsión aceite/agua, agitar durante 3 horas a aproximadamente 500 rpm para evaporar la fase orgánica, y filtrar y secar las microesferas formadas.

Pueden prepararse microesferas cargadas con fármaco de poliésteres alifáticos, polilactida, poliglicólido y poli(lactida-co-glicólido) mediante varios métodos diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos no limitantes en las siguientes referencias: Kemala y otros, 2012; Ghassemi y otros, 2009; Corrigan y Heelan, 2001; Cleland y otros, publicación de WIPO Núm. WO 1995/11009; y Atkins y otros, publicación de WIPO Núm. WO 1995/009613.

En algunos aspectos de este aspecto alternativo, las micropartículas cargadas con rapamicina se envuelven, encapsulan o recubren para permitir su liberación en el tracto intestinal, incluido el colon.

En algunas modalidades de acuerdo con la invención, las micropartículas se recubren con un recubrimiento entérico, que es un recubrimiento que evita la liberación y la absorción de los ingredientes activos hasta que llegan al intestino. Algunos recubrimientos entéricos facilitan la administración de los agentes al colon. En algunas modalidades, el recubrimiento entérico es un recubrimiento EUDRAGIT®. Los recubrimientos EUDRAGIT® incluyen EUDRAGIT® L 100-55, poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1; EUDRAGIT® L 30 D-55, poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1; EUDRAGIT® L-100, poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metilo) 1:1; EUDRAGIT® S 100, poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metilo) 1:2; EUDRAGIT® FS 30 D, poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1; EUDRAGIT® RL, poli(acrilato de etilo-co-metacrilato de metilo-co-cloruro de

metacrilato de trimetilamonioetilo) 1:2:0,2; EUDRAGIT® RS, poli(acrilato de etilo-co-metacrilato de metilo-co-cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo) 1:2:0,1; y EUDRAGIT® E, poli(metacrilato de butilo-co-(2-dimetilaminoetil)metacrilato-co-metacrilato de metilo) 1:2:1. Otros recubrimientos incluyen EUDRAGIT® RS, EUDRAGIT® RL, etilcelulosa y acetato de polivinilo. Los beneficios incluyen la liberación del fármaco dependiente del pH, la protección de los agentes activos sensibles al líquido gástrico, la protección de la mucosa gástrica de los agentes activos, el aumento de la eficacia del fármaco, una buena estabilidad de almacenamiento y el direccionamiento gastrointestinal y del colon, lo que minimiza los riesgos asociados con los efectos sistémicos negativos y mantiene una dosificación eficaz.

En algunos aspectos, el direccionamiento de la rapamicina en el colon puede lograrse mediante la generación de micropartículas de PCL cargadas con rapamicina y posteriormente mediante el recubrimiento de las micropartículas con EUDRAGIT® S 100. Los métodos para fabricar tales micropartículas recubiertas pueden encontrarse en Ghorab y otros, 2011. Brevemente, las micropartículas de PCL cargadas con fármaco se suspenden en una solución que contiene una cantidad apropiada de EUDRAGIT® S 100 disuelto en alcohol etílico. La suspensión se vierte en agua destilada. La mezcla resultante se homogeneiza durante cinco minutos y luego se agita mecánicamente hasta que el disolvente orgánico se evapora por completo. Las micropartículas se recogen, se lavan con ciclohexano dos veces y se secan durante la noche en un desecador.

Algunos otros ejemplos de componentes de recubrimiento entérico incluyen ftalato de acetato de celulosa, copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico, succinato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxilpropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxilpropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico, alginato de sodio y ácido esteárico. El recubrimiento puede incluir polímeros gelificantes hidrófilos adecuados que incluyen, pero no se limitan a, polímeros celulósicos, tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa y similares; polímeros vinílicos, tales como polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y similares; polímeros y copolímeros acrílicos, tales como polímero de ácido acrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de acrilato de etilo-metacrilato de metilo, gomas naturales y sintéticas, tales como goma guar, goma arábica, goma xantana, gelatina, colágeno, proteínas, polisacáridos, tales como pectina, ácido pécico, ácido alginico, alginato de sodio, poliaminocidos, polialcoholes, poliglicoles y similares; y las mezclas de estos. Se contempla la inclusión de cualquier otro agente de recubrimiento conocido por los expertos en la técnica en los recubrimientos de las microcápsulas expuestas en la presente descripción.

El recubrimiento puede comprender opcionalmente un plastificante, tal como sebacato de dibutilo, polietilenglicol y polipropilenglicol, ftalato de dibutilo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo, citrato de tributilo, monoglicérido acetilado, citrato de acetil tributilo, triacetina, ftalato de dimetilo, benzoato de bencilo, butilo y/o ésteres de glicol de ácidos grasos, aceites minerales refinados, ácido oleico, aceite de ricino, aceite de maíz, alcanfor, glicerol y sorbitol o una combinación de estos. El recubrimiento puede incluir opcionalmente una goma. Los ejemplos no limitantes de las gomas incluyen homopolisacáridos tales como goma de algarrobo, galactanos, mananos, gomas vegetales tales como alginatos, goma karaya, pectina, agar, tragacanto, goma arábica, carragenano, quitosano, ácido alginico, otras gomas de polisacáridos (por ejemplo, hidrocoloides), acacia catechu, salai guggal, bodellum indio, goma sopaiba asafétida, goma cambi, *Enterolobium cyclocarpum*, goma de masilla, goma de benjuí, sandarac, goma gambier, butea frondosa (llama de goma del bosque); mirra, konjak manano, goma guar, goma welan, goma gellan, goma tara, goma de algarrobo, goma carragenina, glucomanano, goma galactano, alginato de sodio, goma xantana, goma xantana desacetilada, pectina, polipéctato de sodio, gluten, goma karaya, goma de tamarindo, goma ghatti, goma Acaroide/Yacca/Roja, goma dammar, goma de enebro, goma ester, goma de semilla ipil-ipil, goma talha (acacia seyal) y gomas de células vegetales cultivadas, incluidas las de las plantas de los géneros: acacia, actinidia, aptenia, carbobrotus, chickorium, cucumis, glicina, hibisco, hordeum, letuca, lycopersicon, malus, medicago, mesembryanthemum, oryza, panicum, phalaris, phleum, poliathus, policarbofilo, sida, solanum, trifolium, semilla de *Azalia africana*, goma de *Treculia africana*, goma detarium, goma cassia, goma de algarrobo, goma de *Prosopis africana*, goma de *Colocassia esulenta*, goma de *Hakea gibbosa*, goma khaya, escleroglucano, zea, las mezclas de cualquiera de los anteriores y similares.

Una variedad de otros materiales de revestimiento y sistemas para administrar las microesferas biodegradables cargadas con rapamicina al colon pueden usarse solos o en combinación con un recubrimiento dependiente del pH como EUDRAGIT® S 100. A continuación se ofrecen ejemplos no limitantes.

Pueden incluirse polímeros o copolímeros gelificantes hidrófilos en un material que envuelve una o más microesferas para proporcionar una liberación dependiente del tiempo de las microesferas cargadas con fármaco. Los ejemplos no limitantes de copolímeros gelificantes hidrófilos incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbómeros, alcoholes polivinílicos, polioxietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, poloxámeros o cauchos naturales o sintéticos. Puede incluirse una capa intermedia de estos polímeros para retrasar la liberación del ingrediente activo durante un período de tiempo deseado, como se describe en Poli y otros, (documento núm. EP0572942). Otro ejemplo de material de revestimiento dependiente del tiempo es una matriz de cera que incluye, por ejemplo, ácido behénico, como se describe en Otuska y Matsuda, 1994.

Los polisacáridos que son resistentes a las enzimas digestivas pero que se degradan enzimáticamente por las bacterias en el colon pueden incluirse en un material de revestimiento. Los ejemplos no limitantes incluyen quitosano y pectina como se describe en Coulter (documento núm. EP2380564) y azopolímeros, polímeros de disulfuro, amilosa, pectinato de calcio y sulfato de condroitina como se describe en Watts (documento núm. EP0810857).

Puede usarse una cápsula de almidón recubierta con un recubrimiento entérico como EUDRAGIT® S 100 o EUDRAGIT® L 100, como se describe en Watts (documento núm. EP0180857). Puede usarse una variedad de almidones, que incluyen almidones modificados y derivados de almidón. Los ejemplos no limitantes incluyen hidroxietil almidón, hidroxipropil almidón, carboximetil almidón, almidón catiónico, almidón acetilado, almidón fosforilado, derivados de succinato o almidones injertados.

Puede usarse una capa de polímero rompible insoluble o relativamente insoluble como parte de una estrategia para proporcionar una liberación abrupta de microesferas cargadas con fármaco en el colon. El polímero rompible puede comprender uno o más de una variedad de polímeros adecuados conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, acetato de celulosa, propionato de acetato de celulosa o etilcelulosa. Pueden emplearse diversas estrategias para provocar la rotura del polímero en el colon. Como ejemplo no limitante, el polímero rompible puede diseñarse para que se rompa al encontrar un aumento de presión debido a la peristalsis intestinal, como se describe en Muraoka y otros, 1998. Como otro ejemplo, el polímero rompible puede ser semipermeable y puede incluirse un sólido efervescente en un núcleo que contiene las micropartículas cargadas con fármaco, como se describe en Krogel y Bodmeier, 1999. Como otro ejemplo, una capa de material hinchable, que incluye, pero no se limita a, croscarmelosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa, puede disponerse dentro de la capa de polímero rompible, como se describe en Bussemer y otros, 2001. La entrada controlada de agua más allá de la capa de polímero rompible puede ser proporcionada por el material particulado hidrófilo incrustado, como se describe en Lerner y otros, (Publicación de WIPO Núm. WO 1999/018938).

Un sistema de revestimiento de dos piezas, como se describe en McNeill y otros, (Publicación de WIPO Núm. WO 1990/009168) puede usarse para proporcionar la liberación de microesferas cargadas con fármaco en el colon. Una de las piezas es una cápsula relativamente insoluble en agua con un orificio abierto, que está cubierta por una segunda pieza que se hincha al absorber agua. La hinchazón provoca el desplazamiento del orificio y la liberación del contenido de la cápsula.

Ejemplos de preparaciones de inhibidores de mTOR preferidos

Ejemplo 1 - Desarrollo de métodos para producir nanopartículas de rapamicina. Se usó un intercambio rápido de disolventes para examinar la formación de nanopartículas de rapamicina. Se seleccionaron tres disolventes miscibles en agua 160 y tres tensoactivos solubles en agua para estudiar sus respectivos efectos sobre la formación y la morfología de las nanopartículas de rapamicina. Los disolventes miscibles en agua 160 fueron alcohol isopropílico (disolvente 1), acetona (disolvente 2) y metanol (disolvente 3). Los tensoactivos solubles en agua fueron Pluronic F-68 (Dispersante 1, un copolímero de bloque de PEO-PPO-PEO no iónico), Pluronic F-127 (Dispersante 2, un copolímero de bloque de PEO-PPO-PEO no iónico) y colato de sodio (Dispersante 3, un tensoactivo aniónico). Se disolvió la rapamicina en cada uno de los disolventes miscibles en agua 160 a una concentración de 0,25 % p/v. Los tensoactivos solubles en agua se disolvieron en agua desionizada a concentraciones de 0,5 % p/v, 0,5 % p/v y 1,0 % p/v, respectivamente, para cada uno de los dispersantes. Cada combinación experimental (por ejemplo, NP-1 a NP-9 en la siguiente tabla) consistió en 5 ml de solución de rapamicina y 25 ml de solución de tensoactivo, lo que dio como resultado un factor de dilución de 1:5 de disolvente:agua. Se transfirieron 25 ml de solución de tensoactivo a un vaso de precipitados de 50 ml y se agitó con la ayuda de una microbarra magnética de agitación. La solución de rapamicina se inyectó rápidamente en incrementos de 500 µl con la ayuda de una micropipeta con la punta de la pipeta colocada debajo de la superficie de la solución de tensoactivo rápidamente agitada. Se evaluó cualitativamente el aspecto visual de las nanopartículas resultantes y su estabilidad coloidal después de 24 horas. La siguiente tabla resume las cualidades de las dispersiones de nanopartículas de rapamicina. Cualitativamente, las dispersiones de nanopartículas de rapamicina que tienen una apariencia opalescente de incolora a azul tendrán tamaños de partículas del orden de menos de aproximadamente 300 nm, como lo demuestra su interacción con las longitudes de onda ultravioleta de la luz visible. Mientras que las dispersiones que tienen una apariencia más blanca tendrán tamaños de partículas mayores de aproximadamente 300 nm debido a su interacción con el espectro más amplio de luz visible. Las formulaciones de nanopartículas de rapamicina NP-7 y NP-9 se seleccionaron como métodos preferidos de preparación de nanopartículas.

	Dispersante 1	Dispersante 2	Dispersante 3
5	NP-1 Blanco, sedimentado, redispersable	NP-2 Azul, opalescente, sedimentado, redispersable	NP-3 Claro, agregado, redispersable
	NP-4 Azul, opalescente, algo de sedimentación	NP-5 Blanco, sedimentado, redispersable	NP-6 Azul, opalescente, sedimentado, redispersable
10	NP-7 Azul, opalescente, estable	NP-8: De azul a blanco, sedimentado, redispersable	NP-9 Azul, opalescente, estable

Ejemplo 2 - Preparación de una dispersión de nanopartículas de rapamicina de alta concentración. El disolvente miscible en agua 160 y el dispersante soluble en agua 110 de NP-9 del Ejemplo 1 se usaron para preparar las nanopartículas de rapamicina. Se disolvieron 656 mg de rapamicina en 6,56 ml de Disolvente 3 para producir una solución al 1,0 % p/v. Este volumen de solución de rapamicina se inyectó en 26,25 ml de Dispersante 1 al 1,0 % p/v en agua desionizada. La dispersión de nanopartículas de rapamicina resultante tenía un contenido final de rapamicina de 2,4 % p/p. El tamaño de partícula de la dispersión se determinó mediante dispersión dinámica de la luz en $230 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ con un solo pico.

Ejemplo 3 - Preparación de un recubrimiento entérico soluble en agua. Se añadieron 3,5 g de EUDRAGIT® S 100 a 70 ml de agua desionizada con ligera agitación, lo que da como resultado una dispersión blanca. Se añadieron 1,4 g de hidróxido de sodio a la dispersión con agitación continua. La dispersión resultante se volvió gradualmente transparente e incolora, lo que indica una solución acuosa de S-100. La concentración estimada de hidróxido de sodio fue de 0,5 N.

Ejemplo 4 - Preparación de una materia prima que contiene nanopartículas de rapamicina y un recubrimiento entérico soluble en agua. Las nanopartículas de rapamicina se prepararon como se describe en el Ejemplo 2 y luego se añadieron lentamente a una solución acuosa de EUDRAGIT® S 100 preparada como en el Ejemplo 3. La relación entre rapamicina y EUDRAGIT® S 100 fue 1:9, o el 10 % en peso de carga útil de rapamicina. La dispersión resultante se dejó agitar durante varios minutos para observar la estabilidad. Después de una hora, la dispersión se transformó en un amarillo claro, lo que indica la destrucción de las nanopartículas de rapamicina y un cambio en la rapamicina. La adición de una pequeña cantidad de ácido acético para reducir el pH de la solución por debajo de neutral dio como resultado una solución transparente e incolora.

Ejemplo 5 - Preparación de recubrimiento entérico soluble en agua con un codisolvente miscible en agua. Se añadieron 3,5 g de EUDRAGIT® S 100 a metanol/agua desionizada 30/70 v/v, lo que dio como resultado una dispersión blanca. La dispersión se agitó continuamente hasta que se formó una solución transparente.

Ejemplo 6 - Preparación de una materia prima que contiene nanopartículas de rapamicina y un recubrimiento entérico soluble en agua. Las nanopartículas de rapamicina se prepararon como se describe en el Ejemplo 2 y luego se añadieron lentamente a una solución acuosa de EUDRAGIT® S 100 preparada como en el Ejemplo 5. La relación entre rapamicina y S 100 fue 1:9, o el 10 % en peso de carga útil de rapamicina. La dispersión blanca se dejó agitar durante varios minutos, después de lo cual la dispersión se transformó en una solución transparente, lo que indica que las nanopartículas de rapamicina se habían destruido.

Ejemplo 7 - Preparación de un recubrimiento entérico soluble en agua, parcialmente neutralizado con un codisolvente miscible en agua. Se añadieron 3,5 g de EUDRAGIT® S 100 a metanol/agua desionizada 10/90 v/v, lo que da como resultado una dispersión blanca. La dispersión se valoró hasta que se volvió transparente con 2,000 ml de hidróxido de sodio 4,8 M. La neutralización estimada del S-100 fue del 78 %.

Ejemplo 8 - Preparación de una materia prima que contiene nanopartículas de rapamicina y un recubrimiento entérico soluble en agua. Las nanopartículas de rapamicina se prepararon como se describe en el Ejemplo 2 y luego se añadieron lentamente a una solución acuosa de EUDRAGIT® S 100 como se preparó en el Ejemplo 7. La relación entre rapamicina y EUDRAGIT® S 100 fue 1:9, o el 10 % en peso de carga útil de rapamicina. La dispersión blanca resultante permaneció estable durante varias horas, como lo indica la ausencia de cambio de color o cambio de claridad óptica. El pH final fue de 7,5. El tamaño de partícula de la dispersión final se determinó mediante dispersión dinámica de la luz en $756 \text{ nm} \pm 52 \text{ nm}$ con un solo pico e indica un posible agrupamiento de las nanopartículas de rapamicina en la materia prima resultante.

Ejemplo 9 - Preparación de una materia prima que contiene nanopartículas de rapamicina y un recubrimiento entérico soluble en agua. La solución de rapamicina usada en el Ejemplo 2 se inyectó, con agitación, en la solución acuosa de EUDRAGIT® S 100 preparada en el Ejemplo 7. La relación entre rapamicina y EUDRAGIT® S 100 fue 1:9, o el 10 % en peso de carga útil de rapamicina. Se formó un coloide azul opalescente que permaneció estable durante varias horas como lo indica la ausencia de cambio de color o cambio de claridad óptica. El pH final fue de

7,5. El tamaño de partícula de la dispersión final se determinó mediante dispersión dinámica de la luz en $305 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ con un solo pico.

Ejemplo 10 - Secado por pulverización de materia prima que contiene nanopartículas de rapamicina y un recubrimiento entérico soluble en agua. Las materias primas preparadas en los Ejemplos 8 y 9 se secaron por pulverización y se analizaron para determinar el contenido de rapamicina. Las partículas preparadas a partir del Ejemplo 8 tenían un contenido de rapamicina del 9,5 % en peso. (Rendimiento de rapamicina del 87 %). Las partículas preparadas a partir del Ejemplo 9 tenían un contenido de rapamicina del 7,9 % en peso. (Rendimiento de rapamicina del 80 %).

Ejemplo 11 - Estabilidad en almacenamiento de nanopartículas de rapamicina encapsulada con recubrimiento entérico. Las micropartículas preparadas mediante el secado por pulverización en el Ejemplo 10 se almacenaron en condiciones controladas a temperatura ambiente y 50 % de humedad relativa. Las muestras se analizaron semanalmente para determinar el contenido de rapamicina. Todas las muestras mantuvieron al menos el 95 % de su contenido original de rapamicina en todos los momentos durante al menos tres semanas.

Ejemplo 12 - Preparación de nanopartículas en EUDRAGIT® S 100 como se ilustra en las Figuras 4A y 4B. Se preparó una solución de rapamicina al combinar la rapamicina con metanol (en las Etapas 402 y 404) en una relación al 10 % p/v como 3,03 g de rapamicina y 30,25 ml de metanol. Se preparó una solución de colato de sodio al 1 % p/p al combinar 1,2 g de colato de sodio con 120 ml de agua desionizada como se muestra en la Etapa 424. La formación de nanopartículas se logró al transferir la solución de rapamicina con una jeringa de plástico de 60 ml equipada con una aguja de calibre 20 e inyectar la solución de rapamicina debajo de la superficie de la solución de colato de sodio en un vaso de precipitados de 250 ml (Etapas 406 y 408). La mezcla se realizó con un mezclador de paletas que funcionaba a 300 rpm que produjo una suspensión de nanopartículas de rapamicina. En la Etapa 410, se preparó una solución de EUDRAGIT® S 100 al 10 % p/p mediante la combinación de 20 g de EUDRAGIT® S 100 en una mezcla al 9,7 % p/v con 180 ml de agua desionizada, 25,72 ml de metanol en una mezcla al 12,5 % v/v, y 1,8 g de colato de sodio en una mezcla al 0,875 % p/v. Esta solución de EUDRAGIT® S 100 al 10 % p/p se tituló con hidróxido de sodio 4 M para lograr un pH de entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 7,6. A continuación, las partículas de rapamicina encapsulada se fabricaron al combinar la solución de EUDRAGIT® S 100 con la suspensión de nanopartículas de rapamicina en la Etapa 412. La solución de EUDRAGIT® S 100 y la suspensión de nanopartículas de rapamicina se combinaron en una botella de 500 ml, se añadieron 2,13 g de glicerol y se mezclaron con una barra de agitación magnética. La solución combinada de EUDRAGIT® S 100 y la suspensión de nanopartículas de rapamicina se secaron luego por pulverización y se recogieron. Los parámetros de secado por pulverización (mostrados en la Etapa 418) incluyeron una boquilla de 0,4 mm, una presión de aire de la boquilla de 3 bar, una temperatura del aire de entrada de 110°C , una velocidad de bombeo de la muestra de 5 ml/min y una velocidad del aire de 0,30 m³/min. Una vez que se completa el proceso de microencapsulación de nanopartículas preferido, las nanopartículas pueden clasificarse y tamizarse de acuerdo con el intervalo de tamaño deseado en la Etapa 414. Alternativamente, la dispersión resultante de nanopartículas de rapamicina en la solución de la matriz de liberación controlada puede reducirse a un polvo seco en partículas mediante un proceso adecuado, lo que da como resultado micropartículas de naturaleza heterogénea compuestas por nanopartículas de rapamicina distribuidas aleatoriamente en la matriz de liberación controlada. Este polvo seco en partículas puede luego combinarse con excipientes y prensarse en forma de comprimido como se indica en la Etapa 420.

Métodos de uso de composiciones de rapamicina

"Tratamiento" y "tratar" se refieren a la administración o la aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o la modalidad de un procedimiento o la modalidad en un sujeto con el fin de obtener un beneficio terapéutico para una enfermedad o afección relacionada con la salud, que forma parte de la presente descripción. Por ejemplo, las composiciones de rapamicina de la presente invención pueden administrarse a un sujeto con el fin de tratar o prevenir adenomas o pólipos intestinales y cáncer en un paciente que se ha identificado como en riesgo de desarrollar pólipos intestinales o cáncer intestinal.

Los términos "beneficio terapéutico", "terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refieren a la promoción o la mejora del bienestar de un sujeto. Esto incluye, pero no se limita a, una reducción en la frecuencia o la gravedad de los signos o los síntomas de una enfermedad.

"Prevención" y "prevenir" se usan de acuerdo con su significado ordinario y sencillo. En el contexto de una enfermedad o afección relacionada con la salud en particular, esos términos se refieren a la administración o la aplicación de un agente, fármaco o remedio a un sujeto o la modalidad de un procedimiento o la modalidad en un sujeto con el propósito de prevenir o retrasar el inicio de una enfermedad o condición relacionada con la salud. Por ejemplo, una modalidad incluye administrar las composiciones de rapamicina de la presente invención a un sujeto con riesgo de desarrollar el cáncer y los pólipos intestinales (por ejemplo, un paciente que se ha diagnosticado con FAP) con el propósito de prevenir el cáncer y los pólipos intestinales.

Las composiciones de rapamicina, como se describe en la presente descripción, que incluyen preferentemente las nanopartículas de rapamicina encapsulada, pueden usarse para prevenir, tratar, retrasar o reducir cualquier

enfermedad o afección (o sus precursores o secuelas) para las que se contempla un inhibidor de mTOR como eficaz para el tratamiento, la prevención, o el retraso o la reducción de su progresión. Por ejemplo, en la presente descripción se describen los métodos de uso de las composiciones de rapamicina para tratar o prevenir enfermedades o afecciones que se ha identificado que un paciente tiene riesgo de desarrollar, que incluyen: pólipos intestinales o cáncer intestinal, tales como cáncer colorrectal o FAP; deterioro cognitivo vascular; anemia hemolítica canina; y gingivostomatitis crónica felina (FCGS) y otras enfermedades de las encías y gingivales.

También se contemplan otros usos de las composiciones de rapamicina, como se describe en la presente descripción, que incluyen preferentemente las nanopartículas de rapamicina encapsulada. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,100,899 describe la inhibición del rechazo de trasplantes por la rapamicina; la patente de Estados Unidos núm. 3,993,749 describe las propiedades antifúngicas de la rapamicina; la patente de Estados Unidos núm. 4,885,171 describe la actividad antitumoral de la rapamicina contra la leucemia linfática, los cánceres de colon y de mama, el melanocarcinoma y el ependimoblastoma; la patente de Estados Unidos núm. 5,206,018 describe el tratamiento con rapamicina de carcinomas de piel y mamarios malignos y neoplasias del sistema nervioso central; la patente de Estados Unidos núm. 4,401,653 describe el uso de la rapamicina en combinación con otros agentes en el tratamiento de tumores; la patente de Estados Unidos núm. 5,078,999 describe un método de tratamiento del lupus eritematoso sistémico con rapamicina; la patente de Estados Unidos núm. 5,080,899 describe un método de tratamiento de la inflamación pulmonar con rapamicina que es útil en el alivio sintomático de enfermedades en las que la inflamación pulmonar es un componente, es decir, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, bronquitis y síndrome de dificultad respiratoria aguda; la patente de Estados Unidos núm. 6,670,355 describe el uso de la rapamicina en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares o vasculares periféricas; la patente de Estados Unidos núm. 5,561,138 describe el uso de la rapamicina en el tratamiento de la anemia relacionada con el sistema inmunitario; la patente de Estados Unidos núm. 5,288,711 describe un método para prevenir o tratar una enfermedad vascular hiperproliferativa que incluye hiperplasia de células del músculo liso de la íntima, reestenosis y oclusión vascular con rapamicina; y la patente de Estados Unidos núm. 5,321,009 describe el uso de la rapamicina en el tratamiento de la diabetes mellitus insulín dependiente.

Preparaciones farmacéuticas

Determinados métodos y composiciones expuestos en la presente descripción están dirigidos a la administración de una cantidad eficaz de una composición que comprende las composiciones de rapamicina de la presente invención.

1. Composiciones

Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensoactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales materiales similares y las combinaciones de estos, como sería conocido por un experto en la técnica (Remington's, 1990). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas. Las composiciones usadas en la presente invención pueden comprender diferentes tipos de portadores en dependencia de si se va a administrar en forma sólida, líquida o de aerosol, y si necesita ser estéril para vías de administración tales como la inyección.

El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse a las composiciones ingredientes activos complementarios, que se comentan con mayor detalle a continuación. Para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales, según lo exigen los estándares de la Oficina de Productos Biológicos de la FDA.

La formulación de la composición puede variar en dependencia de la vía de administración. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe amortiguarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero debe volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Con respecto a esto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tales como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos o sólidos para la administración oral; formulaciones de liposomas y nanopartículas; formulaciones de recubrimiento entérico; cápsulas de liberación prolongada; formulaciones para la administración mediante un dispositivo implantable de administración de fármacos; y cualquier otra forma. También pueden usarse soluciones o pulverizadores nasales, aerosoles o inhalantes en la presente descripción.

Las cápsulas pueden ser, por ejemplo, cápsulas de cubierta dura o cápsulas de cubierta blanda. Las cápsulas pueden incluir opcionalmente uno o más componentes adicionales que proporcionen una liberación sostenida.

En determinadas modalidades, la composición farmacéutica incluye al menos aproximadamente un 0,1 % en peso del compuesto activo. En otras modalidades, la composición farmacéutica incluye de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 75 % del peso de la composición, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 % en peso de la composición, por ejemplo, y cualquier intervalo derivado de la misma.

Las composiciones pueden comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero no se limitan a, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal o las combinaciones de estos. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

En determinadas modalidades preferidas, una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes y las combinaciones de estos. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, portadores tales como un portador líquido. Pueden estar presentes varios otros materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar, polímeros acrílicos liberadores de fármacos EUDRAGIT® o cualquier combinación de estos.

En modalidades particulares, puede producirse una absorción prolongada mediante el uso en las composiciones de los agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina, polímeros acrílicos liberadores de fármacos EUDRAGIT® o las combinaciones de estos.

2. Modos de administración

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz.

La composición puede administrarse al sujeto mediante el uso de cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición puede administrarse por vía intravenosa, intracerebral, intracraneal, intraventricular, intratecal, en la corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, ganglios basales, sustancia negra o la región de la sustancia negra, cerebelo, intradérmicamente, por vía intraarterial, intraperitoneal, intralesional, anal, subcutánea, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol (inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña las células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas), o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como conocería un experto en la técnica (Remington's, 1990).

En aspectos particulares de la descripción, la composición se administra a un sujeto mediante el uso de un dispositivo de administración de fármacos. Se contempla el uso de cualquier dispositivo de administración de fármacos para administrar una cantidad eficaz del inhibidor de mTOR o del Complejo 1 de mTOR (mTORC1).

3. Dosificación

Se determina una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de mTORC1 en función del objetivo pretendido. La cantidad a administrar, tanto de acuerdo con el número de tratamientos como la dosis, depende del sujeto a tratar, el estado del sujeto, la protección deseada y la vía de administración. Las cantidades precisas del agente terapéutico también dependen del criterio del médico y son propias de cada individuo.

La cantidad de rapamicina a administrar dependerá de la enfermedad a tratar, la duración deseada y el perfil de biodisponibilidad del implante y el lugar de administración. Generalmente, la cantidad eficaz estará a discreción y sabiduría del médico del paciente. Las pautas para la administración incluyen intervalos de dosis de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg de rapamicina.

Por ejemplo, una dosis del inhibidor de mTORC1 puede ser de aproximadamente 0,0001 miligramos a aproximadamente 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 1,0 miligramos, o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o más. También pueden administrarse dosis múltiples. En algunas modalidades, una dosis es de al menos aproximadamente 0,0001 miligramos. En modalidades adicionales, una dosis es de al menos aproximadamente 0,001 miligramos. En otras modalidades más, una dosis es de al menos 0,01 miligramos. En otras modalidades más, una dosis es de al menos aproximadamente 0,1 miligramos. En modalidades más particulares, una dosis puede ser de al menos 1,0 miligramos. En modalidades incluso más particulares, una dosis puede ser de al menos 10 miligramos. En modalidades adicionales, una dosis es de al menos 100 miligramos o más.

En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, hasta aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivado de la misma. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en la presente descripción, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., pueden administrarse, sobre la base en los números descritos anteriormente.

La dosis puede repetirse según sea necesario según lo determinen los expertos en la técnica. Por tanto, en algunos aspectos de la descripción de los métodos expuestos en la presente descripción, se contempla una dosis única. En otras modalidades, se contemplan dos o más dosis. En algunas modalidades, las dos o más dosis son la misma dosis. En algunas modalidades, las dos o más dosis son dosis diferentes. Cuando se administra más de una dosis a un sujeto, el intervalo de tiempo entre dosis puede ser cualquier intervalo de tiempo determinado por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre dosis puede ser de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas; de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 6 horas; de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 horas; de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 24 horas; de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días; de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, o más, o cualquier intervalo de tiempo derivable dentro de cualquiera de estos intervalos enumerados. En modalidades específicas, la composición puede administrarse diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o en cualquier intervalo de la misma.

Las dosis de rapamicina encapsulada (rapamicina con recubrimiento entérico) y de nanopartículas de rapamicina encapsulada pueden ser diferentes. De acuerdo con las modalidades preferidas de la presente invención, se contemplan dosis en un intervalo de más de 50 microgramos y hasta (o incluso superior) 200 microgramos por kilogramo para la administración diaria, o el equivalente para otras frecuencias de administración. Aunque la dosificación puede variar según las necesidades particulares y los protocolos de tratamiento preferidos de acuerdo con la preferencia del médico, las dosificaciones biodisponibles diarias máximas tolerables (niveles mínimos) para una duración de 28 días son de aproximadamente 200 microgramos de rapamicina (o equivalente) por kilogramo de sujeto, tanto para humanos como para sujetos caninos, aunque los expertos en la técnica entenderían que los intervalos de cantidades de dosis mayores serían tolerables y adecuados cuando se administraran menos de una vez al día, y los intervalos menores serían tolerables cuando se administraran más de una vez al día.

En determinadas modalidades, puede ser conveniente proporcionar un suministro continuo de una composición farmacéutica al paciente. Esto podría lograrse mediante cateterismo, seguido de la administración continua del agente terapéutico. La administración puede ser intraoperatoria o posoperatoria.

4. Tratamientos secundarios y combinados

Determinadas modalidades proporcionan la administración o la aplicación de una o más formas secundarias o adicionales de terapias. El tipo de terapia depende del tipo de enfermedad que se esté tratando o previniendo. La forma secundaria de terapia puede ser la administración de uno o más agentes farmacológicos secundarios que pueden aplicarse en el tratamiento o la prevención de, por ejemplo, pólipos intestinales o cáncer o una enfermedad, trastorno o afección asociada con el cáncer y los pólipos intestinales en un paciente que se ha identificado como en riesgo de desarrollar pólipos intestinales o cáncer intestinal. Otras formas secundarias de terapia pueden ser la administración de uno o más agentes farmacológicos secundarios que pueden aplicarse en el tratamiento o la prevención del deterioro cognitivo vascular o una enfermedad, trastorno o afección asociada con una patología vascular o un deterioro cognitivo vascular. Por ejemplo, la forma de terapia secundaria o adicional puede estar dirigida al tratamiento de la presión arterial alta, colesterol alto, azúcar en sangre alto (o diabetes), una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una afección cardiovascular o una afección vascular periférica.

Si la terapia secundaria o adicional es un agente farmacológico, puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración del inhibidor o mTORC1.

El intervalo entre la administración del inhibidor de mTORC1 y la terapia secundaria o adicional puede ser cualquier intervalo determinado por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el inhibidor de mTORC1 y la terapia secundaria o adicional pueden administrarse simultáneamente, o el intervalo entre tratamientos puede ser de minutos a semanas. En modalidades en las que los agentes se administran por separado, generalmente se aseguraría que no transcurriera un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de modo que cada agente terapéutico aún podría ejercer un efecto combinado ventajoso sobre el sujeto. Por ejemplo, el intervalo entre los agentes terapéuticos puede ser de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas entre sí y, con mayor

preferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas entre sí. En algunas situaciones, puede ser conveniente extender significativamente el período de tiempo para el tratamiento, sin embargo, cuando varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) han transcurrido entre las respectivas administraciones. En algunas modalidades, el momento de la administración de un agente terapéutico secundario se determina sobre la base de la respuesta del sujeto al inhibidor de mTORC1.

5. Kits

También se contempla el uso de kits en determinados aspectos de la presente invención. Por ejemplo, una composición de rapamicina de la presente invención puede incluirse en un kit. Un kit puede incluir un recipiente. Los recipientes pueden incluir una botella, un tubo de metal, un tubo laminado, un tubo de plástico, un dispensador, un recipiente presurizado, un recipiente de barrera, un paquete, un compartimento u otros tipos de recipientes, tales como recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en el que se retienen los hidrogeles. El kit puede incluir marcas en su superficie. Las marcas, por ejemplo, pueden ser una palabra, una frase, una abreviatura, una imagen o un símbolo.

Además, las composiciones de rapamicina de la presente invención también pueden ser estériles y los kits que contienen tales composiciones pueden usarse para preservar la esterilidad. Las composiciones pueden esterilizarse mediante un proceso de fabricación aséptico o esterilizarse después del envasado mediante métodos conocidos en la técnica.

Usos generales de las preparaciones orales de MTOR

Cuando se administra por vía oral a diario, o con otras frecuencias regulares, en dosis correspondientemente eficaces, las preparaciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con las descripciones anteriores, y sus equivalentes, son eficaces para prevenir y tratar diversas enfermedades en humanos y otros animales, y para reducir la progresión de las mismas enfermedades y sus secuelas. Por ejemplo, dicha administración oral permite a un sujeto humano o su cuidador prevenir o tratar diversas afecciones cancerosas y afecciones neurológicas, y precursores y secuelas de estas en humanos.

Preferentemente, las preparaciones de acuerdo con las modalidades preferidas se administran con una frecuencia regular, preferentemente a frecuencias que varían de tres veces por semana (ya sea en tres días consecutivos o en tres días de la semana distribuidos regularmente).

Aunque la dosificación puede variar según las necesidades particulares y los protocolos de tratamiento preferidos de acuerdo con la preferencia del médico, las dosificaciones biodisponibles diarias máximas tolerables (niveles mínimos) para una duración de 28 días son de aproximadamente 200 microgramos de rapamicina (o equivalente) por kilogramo de sujeto, tanto para humanos como para sujetos caninos, aunque los expertos en la técnica entenderían que los intervalos de cantidades de dosis mayores serían tolerables y adecuados cuando se administraran menos de una vez al día, y los intervalos menores serían tolerables cuando se administraran más de una vez al día.

Mientras que los usos de la rapamicina en la técnica anterior pueden haber involucrado dosificaciones diarias recomendadas de aproximadamente 13 microgramos por kilogramo en sujetos humanos, los protocolos oncológicos de acuerdo con las modalidades preferidas de la presente invención usan dosificaciones más altas que las de la técnica anterior, preferentemente en un intervalo de más de 50 microgramos y hasta (o incluso superior) 200 microgramos por kilogramo para la administración diaria, o el equivalente para otras frecuencias de administración. Otras afecciones abordadas por los protocolos de administración oral de la presente invención incluyen la prevención y el tratamiento de enfermedades gingivales en humanos, perros y gatos, ya sea a través de las preparaciones preferidas de rapamicina (o el equivalente) o mediante terapias de combinación con terapia de células madre y/u otro fármaco activo o protocolos de tratamiento botánico.

A diferencia de las dosificaciones relacionadas con la oncología, los protocolos preferidos para la administración oral de las preparaciones descritas en la presente descripción cuando se usan para la prevención y el tratamiento de afecciones neurológicas específicas y reducir la progresión de estas, usan dosificaciones más bajas que las de la técnica anterior. Dichas dosificaciones más bajas son preferentemente de aproximadamente 5 microgramos de rapamicina biodisponible (o el equivalente) por dosis oral diaria y, por lo demás, dichas dosificaciones más generalmente caen en el intervalo preferido de entre 1 y 7 microgramos por kilogramo para la administración una vez al día, o el equivalente para otras frecuencias de administración.

Aunque varias indicaciones neurológicas se dirigen en modalidades alternativas, las modalidades preferidas de los protocolos de administración oral de acuerdo con la presente invención se usan para prevenir y tratar, y reducir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad pre-Alzheimer, la demencia vascular y otras variaciones del deterioro cognitivo en general, en humanos, caninos, felinos y otros tipos de animales. Otras afecciones neurológicas para las que se cree que las modalidades de la presente invención son eficaces también incluyen el tratamiento y la terapia para la lesión cerebral traumática y la lesión traumática de la médula espinal, así como

también la prevención y el retraso de su avance y secuelas. Tales modalidades incluyen prevenir y tratar los trastornos de ansiedad en caninos y felinos, así como también reducir la progresión del deterioro neurológico en sujetos humanos que exhiben indicaciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular o los precursores de la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

Usos específicos de las preparaciones orales de mTOR

Las siguientes descripciones describen los usos de las preparaciones de mTOR oral para enfermedades específicas, y las enseñanzas de la presente invención contemplan el uso de las preparaciones de nanopartículas de rapamicina microencapsulada para estos mismos fines. En combinación con la información de antecedentes con respecto a estas enfermedades, hay descripciones de ejemplo específicas observadas por los inventores y sus colaboradores.

A. Cáncer intestinal y poliposis adenomatosa familiar (FAP)

Se aprecian resultados particularmente beneficiosos mediante la administración oral en la prevención y el tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), así como también el cáncer de colon y otras secuelas de FAP, particularmente en sujetos humanos que se identifican como genéticamente predispuestos a desarrollar FAP. También se aprecian beneficios particulares en la reducción y la prevención de la progresión de la FAP y en la prevención o el retraso de la necesidad de resección colónica que a menudo se requiere antes de los 25 años en humanos con FAP.

1. Cáncer intestinal

El cáncer intestinal abarca una variedad de cánceres, que incluyen el cáncer del intestino delgado, el cáncer gástrico y el cáncer colorrectal. Los síntomas del cáncer intestinal a menudo incluyen, pero no se limitan a, dolor en todo el cuerpo, pérdida de peso inexplicable, dolor o calambres en la mitad del abdomen, un bulto en el abdomen, sangre en las heces, náuseas, distensión abdominal, deficiencia de hierro anemia e ictericia. Históricamente, el tratamiento más común del cáncer intestinal es la cirugía y la radioterapia.

Es más probable que el cáncer intestinal ocurra en algunos pacientes que en otros. Por ejemplo, es más probable que el cáncer intestinal ocurra en un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad inflamatoria intestinal, un pólipo intestinal o un adenoma, poliposis adenomatosa familiar (FAP) o que tiene una mutación que se sabe que provoca un aumento de la señalización de WNT. En otras modalidades, el paciente tiene antecedentes familiares de pólipos intestinales o cáncer intestinal.

El cáncer de intestino delgado puede dividirse en una variedad de subtipos, que incluyen cáncer de yeyuno e íleon, cáncer duodenal, adenocarcinoma, tumores del estroma gastrointestinal, linfoma y tumores carcinoides ileales. El adenocarcinoma es un tipo de cáncer que comienza en el revestimiento del intestino delgado y constituye el 40-50 % de todos los cánceres del intestino delgado. Este tipo de cáncer intestinal ocurre con mayor frecuencia en etapas posteriores de la vida. Las personas con enfermedad de Crohn y algunas otras afecciones hereditarias, tales como la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el síndrome de Peutz-Jeghers, tienen un mayor riesgo de desarrollar adenocarcinomas. Los tumores carcinoides ocurren cuando las células neuroendocrinas crecen de manera anormal y también pueden denominarse tumores neuroendocrinos o cáncer neuroendocrino. Las personas con antecedentes familiares de neoplasia endocrina múltiple o antecedentes familiares de neurofibromatosis tienen más probabilidades de desarrollar tumores carcinoides. Los tumores carcinoides también son más comunes entre las mujeres, los afroamericanos y las personas con determinadas enfermedades que dañan el estómago y reducen la cantidad de ácido del estómago. Los tumores del estroma gastrointestinal comienzan en las células intersticiales de Cajal (ICC) en las paredes del tracto gastrointestinal. Se cree que un antecedente familiar de neurofibromatosis o síndrome de tumor del estroma gastrointestinal familiar aumentará el riesgo de que el paciente desarrolle tumores del estroma. Los linfomas gastrointestinales son un cáncer del sistema linfático que comienza en el tejido linfático. Se cree que la vejez, los factores de riesgo genéticos que provocan un funcionamiento anormal del sistema inmunológico, una dieta alta en grasas animales y baja en frutas y verduras, la exposición a la radiación y a determinados químicos, las deficiencias inmunológicas y algunas infecciones aumentan la probabilidad de desarrollo de un linfoma.

El cáncer colorrectal, comúnmente también conocido como cáncer de colon o cáncer de intestino, es un cáncer provocado por el crecimiento descontrolado de células en el colon, el recto o el apéndice. La mayoría de los cánceres colorrectales se deben al estilo de vida y al envejecimiento, pero algunos están asociados con un trastorno genético subyacente. Por ejemplo, las personas con enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon. Aquellos con antecedentes familiares de cáncer colorrectal en dos o más parientes de primer grado tienen un riesgo de enfermedad de dos a tres veces mayor, y varios síndromes genéticos también están asociados con tasas más altas de cáncer colorrectal. El más común de ellos es el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC o síndrome de Lynch) que está presente en aproximadamente el 3 % de las personas con cáncer colorrectal. Otros síndromes que están fuertemente asociados incluyen: síndrome de Gardner y PAF.

El cáncer gástrico se refiere al cáncer que surge de cualquier parte del estómago y, a menudo, es asintomático o solo provoca síntomas inespecíficos en sus primeras etapas. Se cree que la infección por *Helicobacter pylori* es la causa de la mayoría de los cánceres de estómago, mientras que la gastritis atrófica autoinmunitaria, la metaplasia intestinal y varios factores genéticos se asocian con niveles de riesgo elevados. Una causa muy importante pero prevenible de cáncer gástrico es el tabaquismo. Los cánceres gástricos debidos al tabaquismo ocurren principalmente en la parte superior del estómago cerca del esófago.

2. Poliposis adenomatosa familiar (FAP)

La poliposis adenomatosa familiar (FAP) es una enfermedad autosómica dominante provocada por la mutación del gen de la poliposis coli adenomatosa (APC), localizado en el cromosoma 5 (Kinzler, 1991). Este defecto de la línea germinal acelera el inicio del adenoma-carcinoma, lo que resulta en el desarrollo de numerosos pólipos colorrectales adenomatosos a una edad temprana. La poliposis inevitablemente progresa a cáncer colorrectal si no se trata. Dado el desarrollo predecible de cáncer colorrectal en pacientes con FAP, la estrategia preventiva más segura es la resección quirúrgica del colon cuando se desarrolla poliposis. Las dos cirugías profilácticas principales son la colectomía con anastomosis ileorrectal (IRA) y la proctocolectomía con anastomosis bolsa ileal-anal (IPAA) (Vasen, 2008). El cribado genético y la endoscopia junto con la cirugía profiláctica mejoraron significativamente la supervivencia general de los pacientes con FAP. Obviamente, es muy necesario un enfoque profiláctico farmacológico para prevenir estos resultados en esta población de pacientes.

Sin embargo, menos apreciada es la segunda causa principal de muerte en FAP, el adenocarcinoma duodenal. Casi el 90 % de los pacientes con FAP desarrollan pólipos duodenales, las lesiones precursoras del adenocarcinoma duodenal y el 4,5 % desarrollará adenocarcinoma duodenal durante su vida (Wallace, 1998; Bulow, 2004). A diferencia del colon, la resección quirúrgica profiláctica de la ampolla y/o el duodeno se acompaña de una morbilidad significativa. La cirugía duodenal está actualmente indicada para pacientes con poliposis duodenal grave o carcinoma duodenal. Esta población de pacientes tiene una gran necesidad de terapias adyuvantes a la cirugía para prevenir o reducir la formación de pólipos y la carcinogénesis en el tracto gastrointestinal.

3. Vía de señalización WNT

Las WNT comprenden una familia de 19 glicoproteínas secretadas que funcionan en diversos procesos biológicos tales como la proliferación celular, la supervivencia y la polaridad del segmento durante el desarrollo (Anastas, 2013). Las WNT emiten señales a través de receptores transmembrana incluidos en 10 miembros de la familia frizzled (FZD) de receptores acoplados a proteína G y receptores tirosina quinasas. El primer gen WNT se identificó en el cáncer que surge en modelos de cáncer de mama en ratones y en cáncer de colon en ratones y humanos. Las WNT promueven la estabilización de un factor de transcripción llamado β -catenina (también conocido como CTNNB1). Las WNT controlan tanto las vías canónicas dependientes de β -catenina como las no canónicas independientes de β -catenina. Los estudios apuntan a un papel vital para la señalización de WNT- β -catenina hiperactivada en el cáncer colorrectal (Korinek, 1997; Morin, 1997). En pacientes con FAP se encuentran mutaciones inactivadoras heredadas del gen de la poliposis coli adenomatosa (APC), cuyo producto es un controlador negativo de la estabilidad de la β -catenina. Los pólipos de los pacientes con FAP progresan a carcinomas colorrectales tras la inactivación del supresor de tumores p53 y la activación de mutaciones de KRAS. Tanto APC como CTNNB1 están comúnmente mutados en cánceres colorrectales de pacientes sin FAP.

La alta prevalencia de mutaciones de la vía WNT en muchos tipos de cáncer es evidencia de la importancia de la vía WNT- β -catenina en la carcinogénesis. Las mutaciones en otros miembros de la vía de la señal WNT implicadas en la carcinogénesis incluyen: TCF7L2 (similar al factor de transcripción 7), CTNNB1, WTX (gen del tumor de Wilms en el cromosoma X) y AXIN (consulte la Tabla 1 de Anastas, 2013).

El riesgo de desarrollar pólipos intestinales o cáncer intestinal puede determinarse mediante análisis genéticos. El tratamiento o la prevención de la enfermedad puede instituirse antes o después de cualquier intervención quirúrgica relacionada tal como la polipectomía o cualquier forma de colectomía total o parcial o resección de colon. Los regímenes de dosificación pueden incluir múltiples dosis por día, una dosis por día o dosis regulares con uno o más días de diferencia.

En algunos aspectos, las microesferas cargadas con rapamicina dirigidas al colon pueden usarse para tratar o prevenir algunos cánceres intestinales, particularmente el cáncer colorrectal.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar determinados aspectos no limitantes de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas que se cree que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción, también apreciarán que pueden realizarse muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y todavía obtener un resultado similar o igual sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1

La rapamicina encapsulada en EUDRAGIT® S 100, a veces denominada rapamicina con recubrimiento entérico, aumenta la vida útil en un modelo de ratón de cáncer de colon, denominado *Apc^{Min/+}*. Este modelo de ratón lleva una mutación de la línea germinal en una copia del gen supresor de tumores de ratón que codifica la poliposis coli adenomatosa (*Apc*). *Min* en *Apc^{Min/+}* se refiere a una afección llamada neoplasias intestinales múltiples, que en este modelo de ratón se desarrollan muy temprano en la vida, lo que resulta en una vida útil corta de aproximadamente 180 días. La causa de la muerte de los ratones *Apc^{Min/+}* suele ser una anemia grave debida al sangrado de múltiples pólipos neoplásicos en el intestino. El modelo de ratones *Apc^{Min/+}* imparte una afección hereditaria en humanos llamada poliposis adenomatosa familiar (FAP).

Dado que los pacientes con FAP desarrollan pólipos que eventualmente progresan a cáncer de colon, y dado que los ratones *Apc^{Min/+}* desarrollan neoplasias similares, este modelo de ratón (y otros que contienen mutaciones similares en *Apc*) son ampliamente usados por los investigadores del cáncer intestinal.

Demostrando que el tratamiento con rapamicina con recubrimiento entérico que comienza temprano en la vida en ratones *Apc^{Min/+}* evita que los pólipos se desarrollen y progresen a la etapa de hemorragia, lo que da como resultado una vida útil igual y tal vez mayor que la de los ratones normales de tipo salvaje (Ver Figuras 6A-6B para la comparación con la vida útil del tipo salvaje normal) sugiere fuertemente que un enfoque similar en FAP (y otros tipos de cánceres GI) en pacientes humanos será de gran beneficio.

Los ratones *Apc^{Min/+}* se alimentaron con comida de control Eudragit (0 ppm de rapamicina), una dosis media de rapamicina encapsulada a 14 ppm (2,24 mg/kg/día) o una dosis alta de comida con rapamicina encapsulada a 42 ppm (6,72 mg/kg/día) que comienza a las 6 semanas de edad (Figura 6A, flecha). Todos los ratones que consumieron comida a 0 ppm murieron a los 181 días de edad, mientras que los ratones tratados con rapamicina sobrevivieron entre 570 y 685 días (mediana 668 días) para los ratones que recibieron dosis a 14 ppm y entre 559 días y 1093 días (mediana 937 días). Esta extensión de la vida útil fue estadísticamente significativa (prueba de del orden logarítmico; $p < 0,0025$) para cada dosis (véase la Figura 6B). En la Figura 6B, se comparó la vida útil de los ratones *Apc^{Min/+}* tratados con rapamicina con recubrimiento entérico con los ratones C57BL6 de tipo salvaje o los ratones tratados con RAD001 (everolimus), según lo informado por Fujishita T, Aoki K, Lane HA, Aoki M, Taketo MM en "Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *Apc^{Δ716}* mice" (publicado en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9 de septiembre de 2008; 105(36): 13544-9). Este experimento revela que la rapamicina con recubrimiento entérico es más eficaz que el tratamiento con RAD001 porque la dosis más baja de la rapamicina con recubrimiento entérico (2,24 mg/kg) da como resultado una vida útil más larga que la dosis más alta de RAD001 (10 mg/kg). Además, el 60 % de los ratones *Apc^{Min/+}* que recibieron dietas de rapamicina con recubrimiento entérico a 42 ppm vivieron más allá de los ratones tratados con la dosis más alta de RAD001 y los ratones normales de tipo salvaje.

Los recuentos de pólipos intestinales de los ratones *Apc^{Min/+}* en la necropsia muestran una reducción, especialmente en los ratones tratados con dosis altas. El primer ratón que murió en el grupo con tratamiento de dosis alta no mostró signos visibles de neoplasias intestinales. El segundo ratón que murió tenía tres pólipos. Esta es una prueba de la prevención de la enfermedad neoplásica en un modelo de ratón muy propenso.

La rapamicina encapsulada también mejora la salud general y la vida útil sana de los animales a los que se administran las preparaciones de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, con referencia a los ratones *Apc^{Min/+}* tratados como se describió anteriormente, las Figuras 6A-6B ilustran los datos que respaldan que la rapamicina encapsulada aumenta la vida útil y la salud en tales ratones. La Figura 6A, más particularmente, muestra cómo la rapamicina encapsulada aumentó la vida útil en ratones *Apc^{Min/+}*, y la Figura 6B ilustra cómo la vida útil de los ratones *Apc^{Min/+}* tratados con rapamicina aumentó en comparación con los ratones C57BL6 de tipo salvaje o los ratones tratados con RAD001 (everolimus).

La salud de los ratones se evaluó mediante el control de su actividad. Los ratones más viejos o enfermos se mueven menos que los ratones más jóvenes y sanos. El Nathan Shock Healthspan and Functional Assessment Core del Barshop Institute for Longevity and Aging Studies documentó la actividad de los ratones de control y tratados con rapamicina. Los datos que se muestran en la Figura 7B revelan la disminución en el movimiento del grupo alimentado con 0 ppm (control marcado en los gráficos), que se ha prevenido tanto por dosis de rapamicina media (2,24 mg/kg/día) como alta (6,72 mg/kg/día). Tanto la dosis media como la dosis alta son igualmente eficaces para mantener este aspecto de la salud. Los datos mostrados en la Figura 7B también muestran una diferencia entre el movimiento entre las fases de luz y oscuridad del ciclo diurno para las dosis medias y altas de rapamicina, estando la diferencia ausente en los ratones de control con dosis a 0 ppm. Estos datos indican el mantenimiento de un ritmo diurno y niveles de actividad similares a los de los ratones C57BL/6 de tipo salvaje, lo que sugiere una mejor salud frente a los ratones *Apc^{Min/+}* en la comida de control.

La Figura 7A demuestra que el recuento de pólipos en el momento de la muerte fue menor en los ratones *Apc^{Min/+}* que se trataron con rapamicina con recubrimiento entérico. El primer ratón que murió después del tratamiento con 42 ppm de rapamicina con recubrimiento entérico no tenía pólipos y el segundo solo tenía 3 pólipos. La Figura 7C

demuestra que Rapa encapsulada mantiene hematocritos normales en los ratones *Apc^{Mini/+}*. El hematocrito en los ratones tratados con rapamicina con recubrimiento entérico (en el grupo de dosis alta) fue normal en comparación con los ratones C57BL/6 de tipo salvaje (44 %) incluso a los 550 días, un momento en el que aproximadamente el 5 % de los ratones C57BL/6 de tipo salvaje se informó que murieron por causas naturales. Está claro que la rapamicina con recubrimiento entérico en dosis altas es más eficaz para mantener los hematocritos normales, lo que es indicativo de la represión de mTORC1 (que se muestra en la Figura 8) y la inhibición del desarrollo y el crecimiento de pólipos, lo que conduce a una mayor longevidad en este modelo propenso a tumores.

Las Figuras 8A y 8B muestran una depresión dependiente de la dosis de la fosforilación de rpS6 por el tratamiento crónico con rapamicina con recubrimiento entérico. Recientemente se demostró que rpS6 tiene un papel vital en la biogénesis de los ribosomas necesaria para la síntesis de proteínas, el desarrollo y el crecimiento de neoplasias intestinales. Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Dreazen A, y otros, *Oncogene*. 2013. Tanto las dosis medias como las altas son igualmente eficaces para reprimir esta parte de la señalización descendente de mTORC1.

También se muestran los niveles sanguíneos de rapamicina en las dosis de rapamicina con recubrimiento entérico de 2,24 mg/kg y 6,72 mg/kg (Figura 8C). Estas concentraciones en sangre son más altas que el intervalo terapéutico usado para los receptores de trasplantes de órganos. Trepanier D, Gallant H, Legatt D, Yatscoff R. *Clin Biochem* 1998, 31:345-351. Se observó una respuesta a la dosis en los niveles de rapamicina en el tejido del intestino delgado proximal y distal, el aumento en el intestino distal en comparación con el proximal, que es consistente con el gradiente de pH que se aproxima a la neutralidad, lo que resulta en un aumento de la liberación de fármaco por la administración de Eudragit. Esto implica que la rapamicina con recubrimiento entérico puede ser un método eficaz y conveniente para administrar la rapamicina tanto al intestino delgado como a la sangre, lo que indica que la rapamicina con recubrimiento entérico puede tener efectos tanto locales como sistémicos.

Estos datos del aumento de la vida útil, el aumento de los niveles de actividad, el aumento del hematocrito, la depresión de la fosforilación de rpS6 dependiente de la dosis, la disminución de la producción de pólipos y otros indicadores de salud no se deben exclusivamente a la dosis de rapamicina administrada en la comida. La dosis baja de 2,24 mg/kg/día es menor que otras dosis informadas de rapamicina como 3 mg/kg/día y 10 mg/kg/día por sonda oral (Fujishita y otros, *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(36): 13544-9, 2008) y 40 mg/kg de gránulos de comida (Koehl y otros, *Oncogene*, 29:1553-60, 2010). Sin embargo, y sorprendentemente, la rapamicina encapsulada en Eudragit proporcionó un beneficio terapéutico superior que la rapamicina administrada sola.

Los estudios descritos anteriormente demuestran que la rapamicina encapsulada en la formulación descrita, que se administra entéricamente, previene, retrasa el desarrollo o ralentiza el crecimiento y la progresión de los pólipos intestinales (y el cáncer posterior) en este modelo de ratón.

Ejemplo 2

la rapamicina con recubrimiento entérico aumenta la supervivencia en modelos de ratón FAP más que la rapamicina sin recubrimiento o el everolimus. La rapamicina crónica mejoró la supervivencia de los ratones *Apc^{Mini/+}* (n=5 hembras/grupo) de una manera dependiente de la dosis (Figura 9A, $p < 0,005$, prueba de intervalo logarítmico). La cohorte *Apc^{Mini/+}* alimentada con comida de control vivió 164-182 días (mediana 174) en comparación con la cohorte de rapamicina con recubrimiento entérico a 14 ppm

Ejemplo 3

La rapamicina con recubrimiento entérico afecta directamente a los intestinos de los ratones. En el modelo *Apc^{Mini/+}*, los pólipos rara vez se forman en el colon (Tankak y otros, 2006), y dado que los efectos de la rapamicina con recubrimiento entérico sobre el desarrollo y/o el crecimiento de los pólipos probablemente se deben a su acción directa en el intestino, el estado de mTORC1 se ha evaluado en varios segmentos del intestino de los ratones. Para ello, se usaron inmunoensayos de actividad de mTORC1. En este ensayo, se preparan lisados de proteínas a partir de tejido intestinal disecado de ratones tratados y sin tratar. Los lisados de proteínas se separan en geles de poliacrilamida-SDS y se transfieren a membranas. A continuación, las membranas se probaron con anticuerpos dependientes del estado de fosforilación o independientes del estado de fosforilación (indicado en la Figura 10A). Además, la membrana también se prueba con un anticuerpo específico para una proteína codificada por un ARNm independiente de Cap (no regulado por mTORC1) (Actina, Figura 10A). Los anticuerpos se detectan con un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey. Se calcularon las relaciones para cada anticuerpo contra el control de carga de pan-actina mediante el uso de los recuentos de I.I.K. La respectiva relación entre anticuerpo y pan-actina se usó luego para calcular la relación entre proteína fosforilada y proteína total. Se usó Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) para analizar y graficar los datos. Se usó una prueba t de dos colas no pareada o una prueba de Mann Whitney (no paramétrica para rpS6) para obtener los valores de p. Los valores de p por debajo de 0,05 se consideraron significativos.

La quinasa 1 de S6 de sustrato de mTORC1 fosforila la proteína de la subunidad ribosómica pequeña S6 (rpS6) en respuesta a estímulos de factores de crecimiento y nutrientes (Magnuson B, Ekim B, Fingar DC). Regulación y

función de la quinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) dentro de las redes de señalización de mTOR (Biochem J. 1 de enero de 2012; 441(1): 1-21). Por lo tanto, se midió la fosforilación de rpS6 en ratones hembra C57BL/6 de 607-627 días de edad alimentados con rapamicina con recubrimiento entérico durante 42 días mediante el uso de las mismas dosis que el Programa de Pruebas de Intervención de NIA (14 y 42 ppm) (Wilkinson y otros, 2012; Miller y otros, 2011; Harrison y otros, 2009). El tratamiento crónico con rapamicina con recubrimiento entérico inhibió la fosforilación de rpS6 Ser 240/244 en los segmentos proximales y distales del intestino delgado, lo que demuestra la inhibición de mTORC1 (Figura 10A). Estos resultados se reprodujeron en el intestino distal de múltiples ratones (Figura 10A, panel derecho, Figura 10B). Debido a que rpS6 está codificado por un ARNm que contiene 5' TOP (Meyhaus y otros, 2009) y dado que mTORC1 regula la traducción de ARNm que contienen 5' TOP (Thorren y otros, 2012), también se analizó el contenido de rpS6 en los lisados. No hubo diferencias en los niveles de rpS6 en relación con la actina, codificada por un ARNm sin 5' TOP (Figura 10C). Los niveles en sangre de los ratones tratados promediaron 37 ng/ml y 170 ng/ml para los grupos de 14 y 42 ppm, respectivamente (un aumento de 4,6 veces en respuesta a una concentración 3 veces mayor en la comida) (Figura 10D). Estas concentraciones en sangre son más altas que el intervalo terapéutico usado para los receptores de trasplantes de órganos (Trepanier y otros, 1998). También se observó una respuesta a la dosis en los niveles de rapamicina en el tejido del intestino delgado proximal y distal (Figura 10E). Es importante destacar que hay un aumento en los niveles de rapamicina en el intestino distal en comparación con el proximal (Figura 10F), que es consistente con el gradiente de pH que se aproxima a la neutralidad, lo que resulta en un aumento de la liberación de fármaco por EUDRAGIT®. Dado que la fosforilación de rpS6 por la quinasa de S6 juega un papel en la biogénesis del ribosoma (Chauvin y otros, 2013), la depresión de la fosforilación de rpS6 mediada por rapamicina con recubrimiento entérico indicó una disminución de la biogénesis del ribosoma, lo que inhibiría el crecimiento celular necesario para la formación de pólipos. Por tanto, la rapamicina con recubrimiento entérico es un método eficaz y conveniente para administrar la rapamicina tanto al intestino delgado como a la sangre, lo que indica que la rapamicina con recubrimiento entérico podría tener efectos tanto locales como sistémicos.

También se examinó el estado del otro brazo principal de los efectores de mTORC1, el factor de iniciación de la traducción de unión a Cap, eIF4E y su represor de unión, 4E-BP1, que están implicados en el crecimiento del cáncer (Alain y otros, 2012). No se detectaron efectos significativos en este brazo de la vía, que no incluyen alteraciones en la relación de eIF4E a su represor 4E-BP1 (datos no mostrados). Por tanto, el efecto principal del tratamiento crónico con rapamicina dirigido al intestino delgado parece ser una reducción de la actividad de S6K1 manifestada por una disminución de la fosforilación de rpS6.

Según lo observado en el estudio de Fujishita y otros de ratones *Apc*^{Δ716} (Fujishita y otros, 2008), los ratones *Apc*^{Min/+} tratados con dosis bajas y altas de rapamicina con recubrimiento entérico también desarrollaron adenocarcinoma en el intestino, aunque en menor número en el grupo de dosis alta (Tabla 1). Finalmente, el tratamiento con rapamicina da como resultado la activación de un circuito de retroalimentación negativa que da como resultado la activación de mTORC2 que fosforila y activa Akt (Sarbasov y otros, 2006; O'Reilly y otros, 2006), que es una vía a favor del crecimiento y la supervivencia sugerida para provocar resistencia a la rapamicina (Efeyan y otros, 2010). En nuestro análisis de tejidos, no observamos efectos significativos sobre la fosforilación de Akt Ser473 y una pequeña disminución en los niveles de Akt en el intestino delgado distal (Figuras 10G y 10H). Esto sugiere que es menos probable que la activación de rebote de esta vía de señalización a favor del crecimiento sea un factor en los tumores resistentes.

Dado que los pacientes con FAP desarrollan neoplasia de colon, también se evaluaron los efectos de la rapamicina con recubrimiento entérico en el colon de los ratones C57BL/6. La Figura 11 muestra que el tratamiento con rapamicina con recubrimiento entérico dio como resultado una reducción significativa en la fosforilación de Ser240/244 en el colon en comparación con el control, consistente con la liberación colónica de rapamicina.

Al mostrar que la rapamicina con recubrimiento entérico dirigida al intestino de los ratones *Apc*^{Min/+} evita que los pólipos se desarrollen y progresen a la etapa de sangrado, lo que aumenta la vida útil, sugiere firmemente que un enfoque similar, direccionamiento de la rapamicina al colon, será de gran beneficio para tratar y prevenir la FAP, el cáncer colorrectal, las enfermedades inflamatorias intestinales y las enfermedades intestinales relacionadas con la edad.

B. Deterioro cognitivo vascular

El deterioro cognitivo vascular es un deterioro cognitivo que resulta de una patología vascular subyacente. Los enfoques actuales para tratar y prevenir el deterioro cognitivo vascular se centran en controlar los factores de riesgo de las patologías vasculares que subyacen al deterioro cognitivo vascular, tales como presión arterial alta, colesterol alto, azúcar en sangre alto o diabetes, o una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Mientras que otros han propuesto tratamientos para algunos tipos de demencia, no existe una cura conocida para el deterioro cognitivo vascular y la FDA no ha aprobado ningún fármaco para el tratamiento del deterioro cognitivo vascular. Por tanto, existe la necesidad de métodos y composiciones que puedan tratar y prevenir el deterioro cognitivo vascular.

Los inventores y/o sus colaboradores han descubierto un tratamiento eficaz para el deterioro cognitivo vascular que comprende la rapamicina. Se descubrió que la enfermedad de Alzheimer (AD) en ratones exhibe una patología

vascular subyacente, que se mejoró con el tratamiento con rapamicina con recubrimiento entérico. El tratamiento con rapamicina también mejoró los defectos cognitivos (por ejemplo, el aprendizaje y la memoria) que son característicos de los ratones con AD. Por tanto, la rapamicina puede usarse para tratar o prevenir el deterioro cognitivo vascular.

El término "deterioro cognitivo vascular" se refiere a varios defectos provocados por una patología, enfermedad, trastorno o afección vascular subyacente que afecta al cerebro. Por ejemplo, los accidentes cerebrovasculares, las afecciones que dañan o bloquean los vasos sanguíneos o los trastornos como la hipertensión o la enfermedad de los vasos pequeños pueden provocar deterioro cognitivo vascular. Como se usa en la presente descripción, el término "deterioro cognitivo vascular" incluye defectos leves, tales como los síntomas cognitivos más leves que pueden ocurrir en las primeras etapas del desarrollo de la demencia, así como también los síntomas cognitivos más graves que caracterizan las etapas posteriores en el desarrollo de la demencia.

Los diversos defectos que pueden manifestarse como deterioro cognitivo vascular incluyen síntomas mentales y emocionales (pensamiento lento, problemas de memoria, olvido general, cambios de humor inusuales como depresión o irritabilidad, alucinaciones, delirios, confusión, cambios de personalidad, pérdida de habilidades sociales y otros defectos cognitivos); síntomas físicos (mareos, debilidad de la pierna o del brazo, temblores, movimientos rápidos/arrastre de los pies, problemas de equilibrio, pérdida del control de la vejiga o de los intestinos); o síntomas de comportamiento (dificultad para hablar, problemas del lenguaje como dificultad para encontrar las palabras correctas para las cosas, perderse en un entorno familiar, reír o llorar de manera inapropiada, dificultad para planificar, organizar o seguir instrucciones, dificultad para hacer cosas que solían ser fáciles, capacidad reducida para funcionar en la vida diaria).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar determinados aspectos no limitantes de la invención en lo que se refiere a las preparaciones de rapamicina elaboradas y usadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas para las que las preparaciones preferidas funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y todavía obtener un resultado similar o igual sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1 (Efectos *in vivo* de la rapamicina)

Los colaboradores de los solicitantes han usado técnicas de marcado de giro arterial (ASL) de imágenes por resonancia magnética (MRI) *in vivo*, así como también otras imágenes funcionales, imágenes ópticas *in vivo* y herramientas conductuales y bioquímicas para determinar si el tratamiento con rapamicina afecta la progresión de los déficits establecidos en el modelo de ratón transgénico PDAPP de la enfermedad de Alzheimer ("ratones con AD"). Los ratones con AD y los compañeros de camada no afectados se trataron con rapamicina después de la aparición de alteraciones similares a las de la AD a los 7 meses de edad durante un total de 16 semanas. Los niveles de rapamicina en las regiones del cerebro de los ratones con AD alimentados crónicamente con rapamicina oscilaron entre 0,98 y 2,40 pg/mg. Los niveles en el hipocampo fueron de 1,55 pg/mg (ver Figura 14).

Los ratones con AD sintomáticos alimentados con control mostraron déficits significativos durante el entrenamiento espacial en el laberinto de agua de Morris, como se describió previamente (Figura 12a). Sin embargo, los déficits de aprendizaje de los ratones con AD fueron anulados parcialmente por el tratamiento con rapamicina. La mejora de los déficits de aprendizaje inducida por la rapamicina fue más pronunciada como una inversión en la tasa de adquisición al principio del entrenamiento espacial (Figura 12a). Los ratones con AD alimentados con control mostraron un empeoramiento del rendimiento a medida que avanzaba el entrenamiento, un patrón de comportamiento asociado con un aumento de los niveles de ansiedad en los animales que no aprenden bien. Por el contrario, la adquisición de la tarea espacial para el grupo con AD tratado con rapamicina mejoró durante los primeros 3 días de entrenamiento de una manera indistinguible de los compañeros de camada no transgénicos, pero a diferencia de este grupo, alcanzó una meseta en el día 4 (Figura 12a). La memoria de la ubicación entrenada para la plataforma de escape se deterioró significativamente en los ratones con AD alimentados con control (Figura 12b), como se describió previamente. Sin embargo, la memoria en los ratones tratados con rapamicina era indistinguible de la de los compañeros de camada no transgénicos y mejoró significativamente en comparación con la de los ratones con AD alimentados con control (Figura 12b). Por lo tanto, la administración crónica de rapamicina, que comenzó después de la aparición de déficits cognitivos similares a la AD, mejoró el aprendizaje espacial y restauró la memoria espacial en los ratones con AD sintomáticos.

Los colaboradores de los solicitantes también han examinado los efectos del tratamiento crónico con rapamicina sobre la función hemodinámica en los cerebros de los ratones con AD mediante el uso de MRI de campo alto. Los animales con AD alimentados con control tenían un flujo sanguíneo cerebral global (FSC) significativamente menor en comparación con los compañeros de camada no transgénicos, (Figuras 12e-d), lo que indicó que los ratones con AD tenían anomalías vasculares. El CBF global en los ratones tratados con rapamicina, por el contrario, era

indistinguible del de los grupos no transgénicos (Figuras 12e-d). En sus primeras etapas, la AD se asocia con disfunción sináptica en la corteza entorrinal y el hipocampo, mientras que otras regiones del cerebro como el tálamo se salvan en gran medida. Los colaboradores de los solicitantes han observado que el CBF hipocampal, pero no talámico, se redujo en los ratones con AD tratados con el control (Figuras 12e-g). Sin embargo, el CBF del hipocampo se restauró a niveles indistinguibles de los de los compañeros de camada no transgénicos mediante el tratamiento con rapamicina (Figuras 12e-g).

Los colaboradores de los solicitantes también han determinado la captación de glucosa cerebral en los ratones con AD alimentados con control y rapamicina mediante el uso de tomografía por emisión de positrones (PET). A pesar de las diferencias observadas en el CBF, la tasa metabólica cerebral de glucosa (CMRG1c) no fue significativamente diferente entre los grupos de control y los tratados con rapamicina (Figuras 13a-b). Para probar si los cambios en el CBF fueron provocados por cambios en la vascularización cerebral, los colaboradores de los solicitantes midieron la densidad vascular en los cerebros de los ratones con AD alimentados con control y rapamicina mediante angiografía por resonancia magnética (MRA) de alta resolución. Los ratones con AD tratados con control mostraron una reducción pronunciada en la densidad de los vasos cerebrales con respecto a los compañeros de camada no transgénicos, lo que demuestra además que los ratones con AD exhibían una patología vascular. La reducción de la vascularización cerebral observada en los ratones con AD se anuló mediante el tratamiento con rapamicina (Figuras 13c-d). Por lo tanto, es probable que la disminución de CBF en los ratones con AD surja del daño cerebrovascular, y el CBF restaurado refleja la preservación de la densidad vascular como un resultado del tratamiento con rapamicina.

Los datos resultantes indican que el deterioro vascular puede revertirse mediante el tratamiento crónico con rapamicina a través de un mecanismo que implica la vasodilatación dependiente de NO. El mantenimiento de la integridad vascular mediado por la rapamicina condujo a una disminución de la deposición de A β en los vasos cerebrales, una carga de placa de A β significativamente menor y una menor incidencia de microhemorragias en los cerebros con AD, lo que sugiere que la disminución de la deposición de A β en la vasculatura preserva su funcionalidad e integridad, lo que permite la eliminación continua de A β del cerebro, lo que resulta en una disminución de la carga de placa. Debido a que los déficits de memoria mejoraron en los ratones con AD tratados con rapamicina, los datos sugieren que la eliminación continua de A β a través de la vasculatura conservada puede ser suficiente para mejorar los resultados cognitivos en los ratones con AD. Alternativamente, pueden influir el aumento de la autofagia y la respuesta de la chaperona.

Muchos de los estudios descritos anteriormente proporcionan evidencia de un papel eficaz de la rapamicina con recubrimiento entérico, así como también de las nanopartículas de rapamicina microencapsulada, como se enseña en la presente descripción. Algunos estudios evidencian particularmente el uso en la inhibición de la liberación de NO en el endotelio vascular cerebral durante la progresión de la enfermedad en ratones con AD, lo que sugiere que el deterioro vascular dependiente de mTOR puede ser una característica crítica del envejecimiento cerebral que permite la AD. Además, los datos indican que la inhibición crónica de mTOR por la rapamicina con recubrimiento entérico, una intervención que prolonga la vida útil en ratones, niega la degradación vascular a través de la activación de eNOS en el endotelio vascular cerebral y mejora la función cognitiva después de la aparición de déficits similares a la AD en los ratones transgénicos que modelan la enfermedad. Se espera que la rapamicina, que ya se usa en entornos clínicos, sea una terapia eficaz para las patologías vasculares en los humanos y los ratones con AD. Al proteger contra patologías vasculares que pueden provocar deterioro cognitivo vascular, se espera que la rapamicina sea una terapia eficaz para prevenir y tratar el deterioro cognitivo vascular así como también una variedad de trastornos neurológicos, tales como el pre-Alzheimer y la disfunción cognitiva canina.

Ejemplo 2 (Materiales y métodos)

Ratones. La derivación y la caracterización de los ratones con AD [AD(J20)] se han descrito en otra parte. Los ratones con AD se mantuvieron mediante cruces heterocigotos con ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Aunque el transgén de (h)APP humano es impulsado por un promotor específico de neurona que se activa en ~e14, los cruces heterocigotos se establecieron de tal manera que el animal transgénico era la madre o el padre en aproximadamente el 50 % de las parejas reproductoras para evitar confusiones relacionadas con los efectos potenciales de la expresión de genes trans durante la gametogénesis o los efectos de impresión. Los ratones con AD eran heterocigotos con respecto al transgén. Se usaron como controles compañeros de camada no transgénicos. Los grupos experimentales fueron: sin Tg alimentados con control, n=17; sin Tg alimentados con rapamicina, n=18; Tg alimentado con control, n=10; Tg alimentados con rapamicina, n=10, todos los animales eran machos y tenían 11 meses de edad en el momento de la prueba. Se administró rapamicina durante 16 semanas a partir de los 7 meses de edad. Todos los protocolos experimentales con animales se aprobaron por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio (Número de Garantía de Bienestar Animal: A3345-01).

Tratamiento con rapamicina. Los ratones se alimentaron con comida que contenía rapamicina con recubrimiento entérico microencapsulada a 2,24 mg/kg o una dieta de control como se describe por Harrison y otros (9). Se usó rapamicina a 14 mg por kg de comida (verificado por HPLC). Suponiendo que el ratón promedio pesa 30 g y consume 5 g de comida/día, esta dosis suministró 2,24 mg de rapamicina por kg de peso corporal/día. A todos los ratones se les dio acceso *ad libitum* a la rapamicina o la comida de control y el agua durante la duración del

experimento. Se midieron semanalmente los pesos corporales y la ingesta de comida. El consumo de comida se mantuvo constante y fue comparable para los grupos de control y los alimentados con rapamicina. Los compañeros de camada (ratones transgénicos y no transgénicos) se alojaron juntos, por lo que no pudimos distinguir los efectos del genotipo en el consumo de comida. Aunque no hubo diferencias en el consumo de comida, los pesos corporales de las hembras no transgénicas alimentadas con rapamicina, pero no transgénicas, aumentaron moderadamente durante el tratamiento (aumento del 6,8 % para las hembras no transgénicas alimentadas con rapamicina frente a las alimentadas con control). El mayor aumento en el peso corporal de los animales no transgénicos no es inesperado, ya que los animales no transgénicos de ambos géneros tienden a ser ligeramente (1-3 g) más pesados que los transgénicos con AD.

Preparación animal para la neuroimagen funcional. Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 4,0 % para la inducción y luego se mantuvieron en una mezcla de aire e isoflurano al 1,2 % mediante el uso de una mascarilla. Se controlaron continuamente la frecuencia respiratoria (90-130 lpm) y la temperatura rectal ($37 \pm 0,5$ °C). La frecuencia cardíaca y el nivel de saturación de oxígeno en sangre (SaO₂) se registraron mediante el uso de un sistema MouseOx (STARR Life Science Corp., Oakmont, PA) y se mantuvieron dentro de los intervalos fisiológicos normales.

Tasa metabólica cerebral de glucosa (CMR_{Glc}) - Se inyectaron 0,5 mCi de ¹⁸FDG disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica a través de la vena de la cola. Se dejaron 40 min para la captación de ¹⁸FDG antes de la exploración. A continuación, el animal se trasladó al lecho del escáner (Focus 220 MicroPET, Siemens, Nashville, Estados Unidos) y se colocó en posición prona. Los datos de emisión se adquirieron durante 20 minutos en un modo de lista tridimensional (3D) con una resolución intrínseca de 1,5 mm. Para la reconstrucción de imágenes, los datos de PET 3D se volvieron a combinar en varios fotogramas de 1 segundo de duración mediante el uso de un algoritmo de Fourier. Después de redefinir los datos, se reconstruyó una imagen 3D para cada fotograma mediante el uso de un algoritmo de retroproyección filtrado en 2D. Se aplicaron correcciones de deterioro y tiempo muerto al proceso de reconstrucción. La CMR_{Glc} se determinó mediante el uso de la ecuación del valor de captación estandarizado medio (SUV): $SUV = (AxW)/A_{inj}$, donde A es la actividad de la región de interés (ROI; es decir, la región del cerebro en el estudio), W es el peso corporal de los ratones, y A_{inj} es la dosis de inyección de ¹⁸FDG.

Flujo sanguíneo cerebral. El CBF cuantitativo (con unidad de ml/g/min) se midió mediante el uso de las técnicas de marcado de giro arterial continuo (CASL) basadas en MRI en un imán horizontal de 7T/30 cm y un inserto de gradiente BGA12S de 40G/cm (Bruker, Billerica, MA). Se colocó una pequeña bobina de superficie circular (ID = 1,1 cm) en la parte superior de la cabeza y se colocó una bobina de marcado circular (ID = 0,8 cm), construida en el soporte, en la posición del corazón para CASL. Las dos bobinas se colocaron paralelas entre sí, separadas por 2 cm de centro a centro, y se desacoplaron activamente. Las imágenes emparejadas 2 se adquirieron de forma intercalada con campo de visión (FOV) = 12,8 x 12,8 mm, matriz = 128 x 128, grosor de corte = 1 mm, 9 cortes, duración de marcado = 2100 ms, TR = 3000 ms y TE = 20 ms. El análisis de imágenes CASL empleó códigos escritos en Matlab y el programa STIMULATE (Universidad de Minnesota) para obtener el CBF.

Experimentos de imágenes *in vivo*. Los detalles de los procedimientos experimentales fueron idénticos a los protocolos publicados previamente por los colaboradores de los solicitantes con la Universidad de Texas. Brevemente, los ratones se anestesiaron con isoflurano volátil a través de un cono nasal (inducción al 3 %, mantenimiento al 1,5 %). La profundidad de la anestesia se controló comprobando regularmente el movimiento de los bigotes y el reflejo de retirada del pellizco de la extremidad trasera y la cola. Además, durante la cirugía y las imágenes, se evaluaron periódicamente tres signos vitales principales, que incluyen la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la saturación de oxígeno, mediante el uso del sistema MouseOx (STARR Life Sciences). La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C mediante el uso de una almohadilla térmica controlada por retroalimentación (Gaymar T/Pump). Inicialmente, se afeitó el cuero cabelludo, se hizo una incisión a lo largo de la línea media y se retrajo para exponer la parte dorsal del cráneo. Luego se realizó la extracción del periostio con fórceps y la limpieza del cráneo con un hisopo de algodón estéril. Se colocó una placa de acero inoxidable (VetBond, 3M, St. Paul, MN) en la parte dorsal del cráneo y se atornilló a un marco estereotáxico hecho a medida. Para generar una ventana craneal de cráneo delgado sobre la corteza somatosensorial, el cráneo se rebajó inicialmente con un taladro eléctrico de alta velocidad (Fine Science Tools, Foster City, CA) y posteriormente se rebajó hasta aproximadamente 50 µm mediante el uso de un bisturí quirúrgico bajo un microscopio de disección (Nikon SMZ800). La delgadez óptima fue indicada por la alta transparencia y flexibilidad del cráneo. Se usó líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) para lavar el área rebajada y permitir la vasculatura pial claramente visible a través de la ventana. Se realizaron imágenes *in vivo* de la vasculatura cortical mediante el uso de un Olympus FV1000 MPE con un objetivo de inmersión en agua 40X 0,8 NA (Nikon). Para iluminar la vasculatura, se inyectó FITC-dextrano o rodamina-dextrano disueltos en PBS esterilizado (300 µl, 10 mg/ml) a través de la vena de la cola al comienzo de los experimentos. Para observar el óxido nítrico (NO) derivado de los vasos sanguíneos, se disolvió el colorante indicador de NO DAF-FM (Molecular Probes) en DMSO, se diluyó en una solución de rodamina-dextrano (250 µl) y se introdujo en los vasos sanguíneos mediante inyección en la vena de la cola. Se adquirieron secuencialmente pilas z de alta resolución de la vasculatura de la capa cortical I en diferentes momentos. Los complementos de imagen J del NIH stackreg y turboreg se usaron para alinear las pilas z o las proyecciones z de intensidad máxima de las pilas z para facilitar la identificación y comparación de los mismos vasos sanguíneos. El diámetro de los vasos sanguíneos se analizó mediante el diámetro del vaso del complemento de la imagen J. Para la aplicación del fármaco, se inyectó intraperitonealmente la rapamicina (250 µl, solución de 10 mg/kg en PBS) o un inhibidor de la

NO sintasa L-NAME (250 µl, solución de 30 mg/kg en PBS). Se inyectó la acetilcolina (300J.II, 7,5 µl/ml de solución en PBS), como un control positivo para la vasodilatación, junto con la rodamina-dextrano y DAF-FM por vía intravenosa a través de la vena de la cola.

5 Pruebas de comportamiento. El laberinto de agua de Morris (MWM) (54) se usó para probar la memoria espacial. Todos los animales no mostraron deficiencias en las habilidades de natación, natación direccional o trepar a una
 10 plataforma con señales durante el entrenamiento previo y no tenían deficiencias sensoriomotoras según se determinó con una batería de tareas neuroconductuales realizadas antes de la prueba. Se evaluó la capacidad de natación de todos los grupos 2 días antes de la prueba. El procedimiento descrito por Morris y otros se siguió como
 15 se describe. Los experimentadores eran ciegos con respecto al genotipo y al tratamiento. Brevemente, a los ratones se les administró una serie de 6 ensayos, con 1 hora de diferencia en un tanque de color claro lleno de agua opaca blanqueada mediante la adición de pintura no tóxica a una temperatura de $24,0 \pm 1,0$ °C. En la parte visible del protocolo, se entrenó a los ratones para que encontraran una plataforma sumergida de 12x12 cm (1 cm por debajo
 20 de la superficie del agua) marcada con un poste de color que sirvió como un punto de referencia colocado en diferentes cuadrantes de la piscina. Los animales se entrenaron para encontrar la plataforma con 6 nados/día durante 5 días al seguir el mismo procedimiento descrito anteriormente. Al final del entrenamiento, se administró una prueba de sonda
 25 de 45 segundos en la que se retiró la plataforma de la piscina. El número de veces que cada animal cruzó la ubicación de la plataforma anterior se determinó como una medida de retención de la ubicación de la plataforma. Durante el transcurso de la prueba, los animales se controlaron diariamente y sus pesos se registraron
 30 semanalmente. El desempeño en todas las tareas se registró mediante un sistema de seguimiento de video basado en computadora (Water2020, HVS Image, Reino Unido). Los animales que pasaron más del 70 % del tiempo de prueba en nado tigmotáctico se eliminaron del estudio. Los datos se analizaron fuera de línea mediante el uso de HVS Image y se procesaron con Microsoft Excel antes de los análisis estadísticos.

Determinaciones de electrotransferencia y Aβ. Los ratones se sacrificaron por sobredosis de isoflurano seguida de
 35 dislocación cervical. Los hemiserebros se congelaron instantáneamente. Un hemiserebro se homogeneizó en N2 líquido mientras que el otro se usó en determinaciones inmunohistoquímicas (57 por grupo). Para los análisis de electrotransferencia, las proteínas de las fracciones solubles de homogeneizados de LN2 de cerebro se resolvieron
 40 mediante SDS/PAGE (Invitrogen, Temecula, CA) en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF, que se incubó en una solución al 5 % de leche descremada o en BSA al 5 % durante 1 hora a 20 °C. Después de la incubación durante la noche a 4 °C con anti-APP (CT15 o anti-GFAP), las transferencias se lavaron en TBS-Tween 20 (TBS-T) (Tween 20 al 0,02 %, Tris 100 mM pH 7,5; NaCl 150 mM) durante 20 minutos y se incubó a
 45 temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios apropiados. Luego, las transferencias se lavaron 3 veces durante 20 minutos cada una en TBS-T y luego se incubaron durante 5 minutos con Super Signal (Pierce, Rockford, IL), se lavaron nuevamente y se expusieron a una película o se tomaron imágenes con un generador de imágenes de modo variable Typhoon 9200 (GE Healthcare, Nueva Jersey). Los niveles de Aβ₄₀ y Aβ₄₂ humanos, así como también los niveles de Aβ₄₀ endógeno de ratón, se midieron en homogeneizados de cerebro en guanidina mediante
 el uso de ensayos ELISA tipo sándwich específicos (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se describe.

Inmunohistoquímica e imagen confocal de tejidos fijados. Se fijaron posteriormente criosecciones coronales de diez
 50 micrómetros de cerebros congelados instantáneamente en paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con anticuerpos específicos de Aβ (6E10, 10 µg/ml) seguido de anti-IgG de conejo obtenido en burro conjugado con AlexaFluor594 (1:4000, Molecular Probes, Invitrogen, CA) y con lectina biotinilada de Lycopersicon Esculentum (Tomate) (1:4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) seguido de estreptavidina-AlexaFluor488, conjugada (1:500, Molecular Probes, Invitrogen, CA) y fotografiada con un microscopio confocal de barrido láser (Nikon Eclipse TE2000-U) que
 55 usa un láser de argón 488 y un filtro de 515/30 nm para el fluoróforo AlexaFluor488 y un láser de helio-neón 543,5 y un filtro de 590/50 nm para el fluoróforo AlexaFluor594. Se obtuvieron pilas de imágenes confocales para cada canal por separado en $z=0,15$ µm mediante el uso de un objetivo de 60X. Se procesaron pilas Z de imágenes confocales mediante el uso del programa Volocity (Perkin Elmer). Las imágenes se recogieron en el hilio de la circunvolución dentada (y/o el estrato radiactivo del hipocampo inmediatamente debajo de la capa CA1) en Bregma $\sim -2,18$. Se usó como referencia el atlas de cerebro de ratón MBL.

60 Microhemorragias. Las criosecciones coronales de diez micrómetros de cerebros congelados instantáneamente fijados posteriormente en paraformaldehído al 4 % se lavaron 3 veces en solución salina amortiguada con Tris (TBS) (Fisher BioReagents, NJ) y se sumergieron en tioflavina-S al 1 % (Sigma Life Sciences, St. Louis, MO). A continuación, las secciones se lavaron 3 veces en agua destilada y se sumergieron en trihidrato de hexacianoferrato de potasio(III) al 2 % (Santa Cruz Biotechnology, CA) y ácido clorhídrico al 2 % (Sigma Life Sciences). Después
 65 de tres lavados en TBS, las secciones se cubrieron con un cubreobjetos con reactivo anti-decoloración ProLong® Gold con DAPI (Life Technologies, CA). El número de microhemorragias por sección se contó en Bregma - 2,18 mediante

el uso de un objetivo de 40X en un microscopio Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Alemania) mediante el uso de 4 secciones por animal, y se promedió el número de microhemorragias para cada animal.

Análisis estadístico. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) y StatView. En experimentos de dos variables, se usó ANOVA bidireccional seguido de las pruebas post-hoc de Bonferroni para evaluar la importancia de las diferencias entre las medias de los grupos. Al analizar los experimentos de una variable con más de 2 grupos, se evaluó la significancia de las diferencias entre las medias mediante el uso de ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Tukey. La evaluación de las diferencias entre dos grupos se evaluó mediante el uso de la prueba t de Student. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Ejemplo 3 (Otros modelos animales de deterioro cognitivo vascular)

Pueden usarse otros modelos animales de deterioro cognitivo vascular (que incluyen modelos de roedores) para caracterizar aún más los efectos beneficiosos del tratamiento con rapamicina que se observaron en los estudios descritos anteriormente. Ver Nishio K y otros, *Stroke* 41(6):1278-84, 2010; Ihara M y Tomimoto H, *J. of Aging Research*. Article ID 978761, 2011; Tomimoto H y otros, *J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 25:S263 (2005). Dichos modelos de roedores pueden probarse como se describe anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. Por ejemplo, a los sujetos roedores se les puede administrar la rapamicina o un control negativo y posteriormente evaluarlos mediante el uso de los protocolos conductuales, de formación de imágenes, bioquímicos, y metabólicos, y de flujo sanguíneo descritos en los Ejemplos 1 y 2.

C. FCGS, AIHA, liquen plano, lupus y otros trastornos autoinmunitarios

Cuando se administra por vía oral a diario, o con otras frecuencias regulares (como tres veces por semana), en dosis correspondientemente eficaces, se cree que las preparaciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con las descripciones anteriores y sus equivalentes son eficaces para prevenir y tratar diversas enfermedades autoinmunitarias en humanos, caninos, felinos y otros animales, y para retrasar o reducir la progresión de esas enfermedades y sus secuelas. Por ejemplo, tal administración oral en un sujeto canino permite la prevención o el tratamiento de la anemia hemolítica canina y otras anemias hemolíticas autoinmunitarias (AIHA), y tal administración oral en humanos u otros animales permite la prevención y el tratamiento del liquen plano y el lupus.

Como otro ejemplo, cuando se administra por vía oral a diario o tres veces por semana, o con otras frecuencias regulares, en dosis correspondientemente efectivas, las preparaciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con las descripciones anteriores, y sus equivalentes, son eficaces para prevenir, tratar y reducir la progresión de varios enfermedades gingivales. Preferentemente, las preparaciones de acuerdo con las modalidades preferidas se administran con una frecuencia regular, preferentemente en períodos superiores a un año en un régimen diario o tres veces por semana. Tenga en cuenta que la dosificación puede ocurrir con mayor o menor frecuencia. Las enfermedades gingivales particularmente identificadas incluyen la gingivitis estomatitis (a/k/a Gingivoestomatitis), que incluye enfermedades conocidas como la gingivoestomatitis linfocítica o plasmocítica.

Por ejemplo, se observó una eficacia positiva en felinos con estomatitis gingival crónica, cuando las preparaciones de nanopartículas de rapamicina microencapsulada de acuerdo con la presente invención se administraron tres veces a la semana por vía oral, en cápsulas que contenían dosis de 200, 400 y 600 microgramos/kilogramo, de forma diversa durante dos, cuatro, seis y ocho semanas de duración. Particularmente, en estudios controlados siguiendo un protocolo que confirmó la presencia inicial de gingivoestomatitis crónica felina (FCGS) de media a grave, una enfermedad gingival autoinmunitaria, las preparaciones de nanopartículas microencapsuladas producidas de acuerdo con el proceso ilustrado en las Figuras 1-4B no solo detuvo la progresión de FCGS en todos los sujetos evaluados, sino que también redujo significativamente la gravedad de FCGS en la mayoría, si no en todos, de los sujetos evaluados. Más particularmente, como se ilustra en la Figura 5, un protocolo de tratamiento de FCGS de media a grave con preparaciones de nanopartículas microencapsuladas producidas de acuerdo con el proceso ilustrado en las Figuras 1-4B tres veces a la semana durante 8 semanas consecutivas mostró una gravedad reducida de FCGS en los dieciséis sujetos felinos que participaron en el estudio.

También se aprecian resultados particularmente beneficiosos mediante la administración oral regular de varias semanas en la prevención y el tratamiento de la anemia hemolítica canina, así como también de las enfermedades gingivales. La administración oral "regular" puede incluir la administración oral de cápsulas, comprimidos u otras formas de dosificación oral de nanopartículas de rapamicina microencapsulada (o sus equivalentes) al menos dos veces por semana, y preferentemente al menos tres veces por semana, mientras que los protocolos de tratamiento alternativos pueden lograrse mediante dosificaciones múltiples por día también.

En cualquier protocolo de tratamiento particular, debe apreciarse que la dosificación puede variar en función de las necesidades particulares y los protocolos de tratamiento preferidos según la preferencia, y en dependencia del peso del sujeto en particular. Los expertos en la técnica comprenderán que serían tolerables y adecuados intervalos de cantidades de dosis mayores cuando se administraran con menos frecuencia que una vez al día, y que serían tolerables intervalos menores cuando se administraran con más frecuencia que una vez al día.

Mientras que los usos de la rapamicina en la técnica anterior pueden haber involucrado dosificaciones diarias recomendadas de aproximadamente 13 microgramos por kilogramo en sujetos humanos, los protocolos oncológicos de acuerdo con las modalidades preferidas de la presente invención usan dosificaciones más altas que las de la técnica anterior, preferentemente en un intervalo de más de 50 microgramos y hasta (o incluso superior) 200 microgramos por kilogramo para la administración diaria, o el equivalente para otras frecuencias de administración. Otras afecciones abordadas por los protocolos de administración oral de la presente invención incluyen la prevención y el tratamiento de la anemia hemolítica en caninos, felinos, humanos y otros animales, ya sea a través de las preparaciones preferidas de rapamicina (o el equivalente) o mediante terapias de combinación con terapia de células madre y/u otros protocolos de tratamiento activos farmacéuticos o nutracéuticos.

A diferencia de las dosificaciones relacionadas con la oncología, los protocolos preferidos para la administración oral de las preparaciones descritas en la presente descripción cuando se usan para la prevención y el tratamiento de afecciones neurológicas específicas y reducir la progresión de estas, usan dosificaciones más bajas que las de la técnica anterior. Dichas dosificaciones más bajas son preferentemente de aproximadamente 5 microgramos de rapamicina biodisponible (o el equivalente) por dosis oral diaria y, por lo demás, dichas dosificaciones más generalmente caen en el intervalo preferido de entre 1 y 7 microgramos por kilogramo para la administración una vez al día, o el equivalente para otras frecuencias de administración.

Aunque varias indicaciones están dirigidas en las modalidades alternativas, las modalidades preferidas de los protocolos de administración oral de acuerdo con la presente invención son más estables, más biodisponibles y eficaces, y encuentran una mejor biodistribución, para el tratamiento y la prevención y la reducción de la progresión de los trastornos genéticamente predispuestos y los trastornos relacionados con la edad, con beneficios sorprendentes, especialmente en los campos de la prevención y el tratamiento de la anemia hemolítica en caninos y la gingivitis en felinos, y se cree que tiene beneficios análogos en humanos y otros animales.

Aspectos de la descripción con otras rapamicinas

La presente invención se refiere directamente a la propia rapamicina. Los aspectos más amplios de la descripción se relacionan con análogos y derivados de la rapamicina, y con la producción de una preparación oral más estable y eficaz para administrar un agente para unirse, interactuar con o regular de otro modo la actividad de la ruta de mTOR.

Por consiguiente, en aspectos de la descripción, cualquiera de las modalidades particulares descritas anteriormente puede modificarse al sustituir una o más rapamicinas en lugar de (o además de) la rapamicina. Para los propósitos correspondientes de estas descripciones, los rapálogos y todos los inhibidores de la vía mTOR deben considerarse como "rapamicinas" (es decir, el plural de la rapamicina). Además, en este contexto y dondequiera que un contexto se relacione con cualquiera de las rapamicinas en lugar de solo la rapamicina, cualquier referencia relacionada a "rapamicina encapsulada" debe leerse como una enseñanza no solo sobre partículas discretas que incluyen la rapamicina, sino también sobre partículas discretas que incluyen cualquiera o más rapamicinas.

Administración en combinación con otras terapias

Debe entenderse que la descripción anterior enfatiza determinadas modalidades específicas de la invención. Modalidades alternativas pueden implicar la administración de la rapamicina en combinación con otras terapias. Tales terapias incluyen, pero no se limitan a, raspado dental; uso a largo plazo de productos de higiene dental antibacterianos; raspado profesional y cepillado de dientes a largo plazo con clorhexidina al 0,2 %; corticosteroides, sales de oro; antibióticos; gel de gluconato de clorhexidina; técnicas radicales de extracción dental de premolares, molares u otros dientes; terapia de radiación; crioterapia; antibióticos con actividad contra organismos gramnegativos y anaerobios (que incluyen la combinación amoxicilina-ácido clavulánico, enrofloxacin, lincomicina, clindamicina, espiramicina, metronidazol y tetraciclinas); corticosteroides; inyección subgingival de hasta 10 miligramos de triamcinolona; prednisolona, metilprednisolona o triamcinolona a largo plazo; metilprednisolona; aurotimalato de sodio; aurotioglucosa; azatioprina; ciclofosfamida; clorambucilo; inmunoestimulador; PIND-ORF; acetato de megestrol; lactoferrina; salicilato de sodio; meloxicam; interferón; talidomida; agentes antivirales; AZT; PMEAs; láseres de tejidos blandos; multivitamina; suplementación antioxidante; y cauterio químico.

Alternativas generales

Se contempla específicamente que cualquiera de las modalidades particulares de la rapamicina encapsulada descritas en la presente descripción puede proporcionarse en dosis orales diarias (una o dos veces al día) para cualquiera de las aplicaciones médicas o veterinarias a las que se hace referencia a lo largo de esta especificación o que pueden referenciarse en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2012/0064143 y cualquier otra publicación que describa los posibles usos de la rapamicina encapsulada. También debe entenderse que los regímenes de dosificación descritos en la presente descripción con respecto a las indicaciones específicas también pueden usarse con cualquiera o todas las otras indicaciones discutidas. El régimen de dosificación incluiría tanto la concentración de rapamicina administrada así como también la frecuencia de administración.

Las modalidades alternativas de la presente invención incluyen administrar la rapamicina localmente en la cavidad bucal y al menos un polímero, de manera que dicho sistema se adhiera a una superficie en la cavidad bucal y permanezca adherido a la misma durante al menos 1 hora. La administración también puede incluir una composición de barniz precursora líquida y de liberación sostenida para este sistema. Este proceso se discute en detalle en Friedman y otros (documento núm. US 2013/0018069).

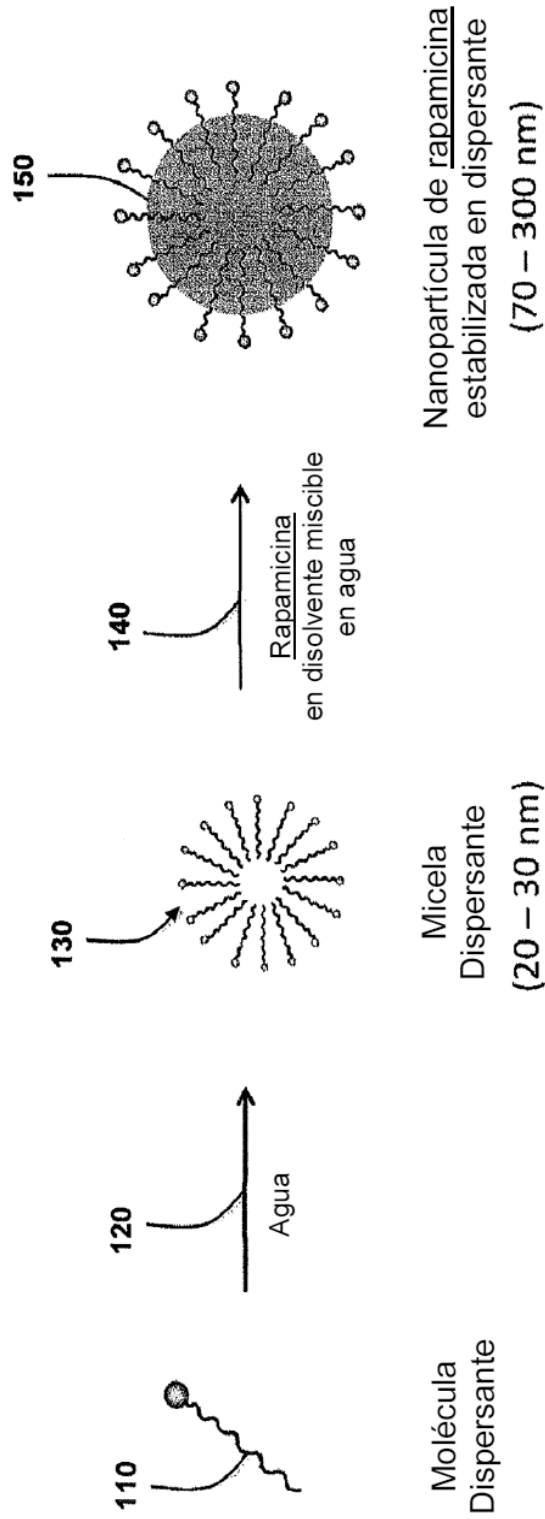
Para otras alternativas, debe entenderse que cualquier limitación discutida con respecto a una modalidad de la invención puede aplicarse a cualquier otra modalidad de la invención. Además, cualquier composición de la invención puede usarse en cualquier método de la invención, y cualquier método de la invención puede usarse para producir o usar cualquier composición de la invención. Cualquier modalidad de la presente invención puede consistir o consistir esencialmente en, en lugar de comprender/incluir/contener/tener, las características y/o etapas descritas.

Los materiales descriptivos incluyen: *Feline Gingivostomatitis*, Ross Harley PhD; *Feline Chronic Gingivitis Stomatitis*, Dentalvets 2013, http://www.dentalvets.co.uk/files/Docs/Common%20Case%20Types/FCGS/FCGS_May2013.pdf; *The Disease Formerly Known as Lymphocytic Plasmacytic Gingivo-stomatitis*, Fraser A. Hale, www.toothvet.com (December 2010).

REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica de micropartículas para su uso en un método de tratamiento de una o más enfermedades oncológicas, neurológicas o autoinmunitarias en un sujeto animal (que puede ser un sujeto animal humano), que comprende:
 - i. una matriz de excipiente sólido que comprende una composición de polímero que permanece intacta cuando se expone a condiciones ácidas del canal alimentario de un animal del tipo de dicho sujeto animal y que se desintegra cuando se expone a condiciones básicas de porciones intestinales específicas de dicho canal alimentario; y
 - ii. nanopartículas de rapamicina dispersas dentro de dicha matriz de excipiente sólido, dichas nanopartículas de rapamicina comprenden un compuesto inductor de micelas, tal como colato de sodio, y un núcleo farmacéuticamente activo;
 - iii. dicho núcleo farmacéuticamente activo comprende rapamicina;
 - iv. dicho compuesto inductor de micelas induce naturalmente la formación de micelas dentro de una solución de dicho compuesto inductor de micelas, dichas micelas tienen propiedades que promueven la estabilidad de dicha rapamicina cuando dichas nanopartículas de rapamicina se dispersan dentro de dicha matriz; y
 - v. el método que comprende administrar por vía oral dicha preparación a dicho sujeto animal varias veces por semana durante una duración de varias semanas, en cantidades eficaces, en donde dicho sujeto animal necesita la prevención o el tratamiento, o una progresión retardada, de una o más enfermedades oncológicas, neurológicas o autoinmunitarias.
2. La preparación farmacéutica de micropartículas para el uso de la reivindicación 1, en donde en el método dicha administración oral comprende la administración por vía oral de dicha preparación a una frecuencia de tres o más veces por semana, en una dosis que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno gingival en el sujeto animal cuando se administra a dicha frecuencia.
3. La preparación farmacéutica de micropartículas para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas una o más enfermedades oncológicas, neurológicas o autoinmunitarias incluyen una o más de las siguientes: enfermedad gingival; deterioro cognitivo en caninos; deterioro neurológico en sujetos humanos que exhiben indicaciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular o precursores de la aparición de la enfermedad de Alzheimer; poliposis adenomatosa familiar (FAP), cáncer de colon u otras secuelas de FAP; y trastornos de ansiedad.
4. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 1, en donde dicha composición de polímero comprende un copolímero de ácido metacrílico.
5. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 4, en donde dicho copolímero de ácido metacrílico incluye metacrilato de metilo.
6. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 4, en donde dicho copolímero comprende el ácido metacrílico y el metacrilato de metilo en una relación de comonomeros de 1:1.
7. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 4, en donde dicho copolímero comprende el ácido metacrílico y el metacrilato de metilo en una relación de comonomeros de 1:2.
8. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 4, en donde dicho copolímero tiene un pH de la disolución de aproximadamente 7.
9. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 1, en donde dicha preparación farmacéutica de micropartículas incluye una cantidad de rapamicina que es al menos aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 75 % en peso de dicha preparación farmacéutica de micropartículas.
10. La preparación farmacéutica de micropartículas de la reivindicación 1, en donde dichas nanopartículas tienen un tamaño en un intervalo de 1 nanómetro a aproximadamente 1 micra.

Nanopartículas de rapamicina

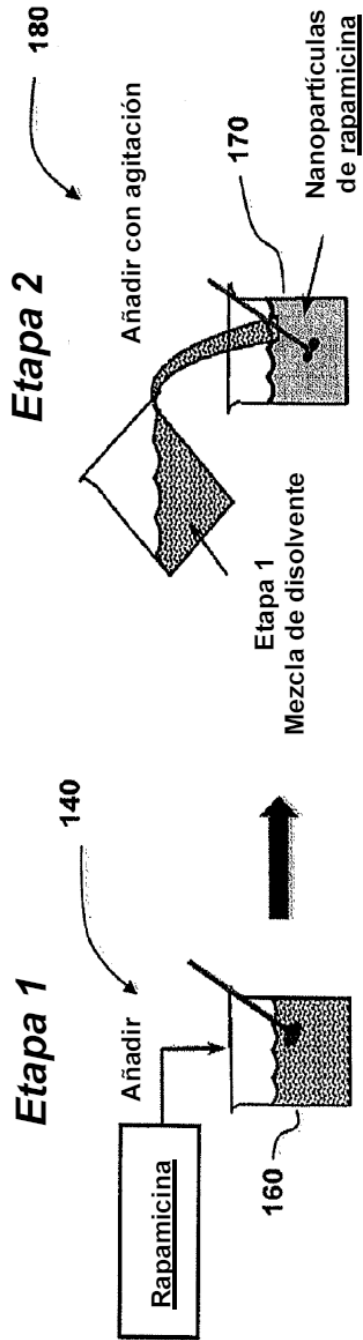


FYI: El número aproximado de moléculas de rapamicina en una nanopartícula puede estimarse como sigue:

$$N_R = \frac{1,18 \times 602 \times \pi \times D^3}{914,2 \times 6}$$

por ejemplo: $D = 230 \text{ nm}$, entonces $N_R = 4,9 \times 10^6$, o aproximadamente 5 millones de moléculas

Figura 1



Disolvente miscible en agua
por ejemplo, acetona, metanol, etc.

Agua con dispersantes

Figura 2

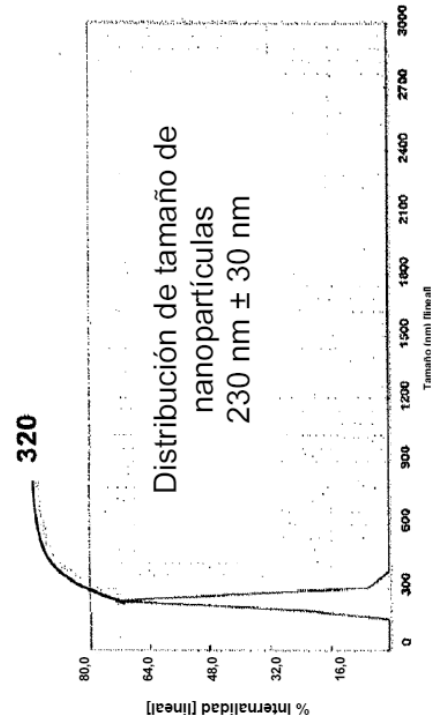


Figura 3

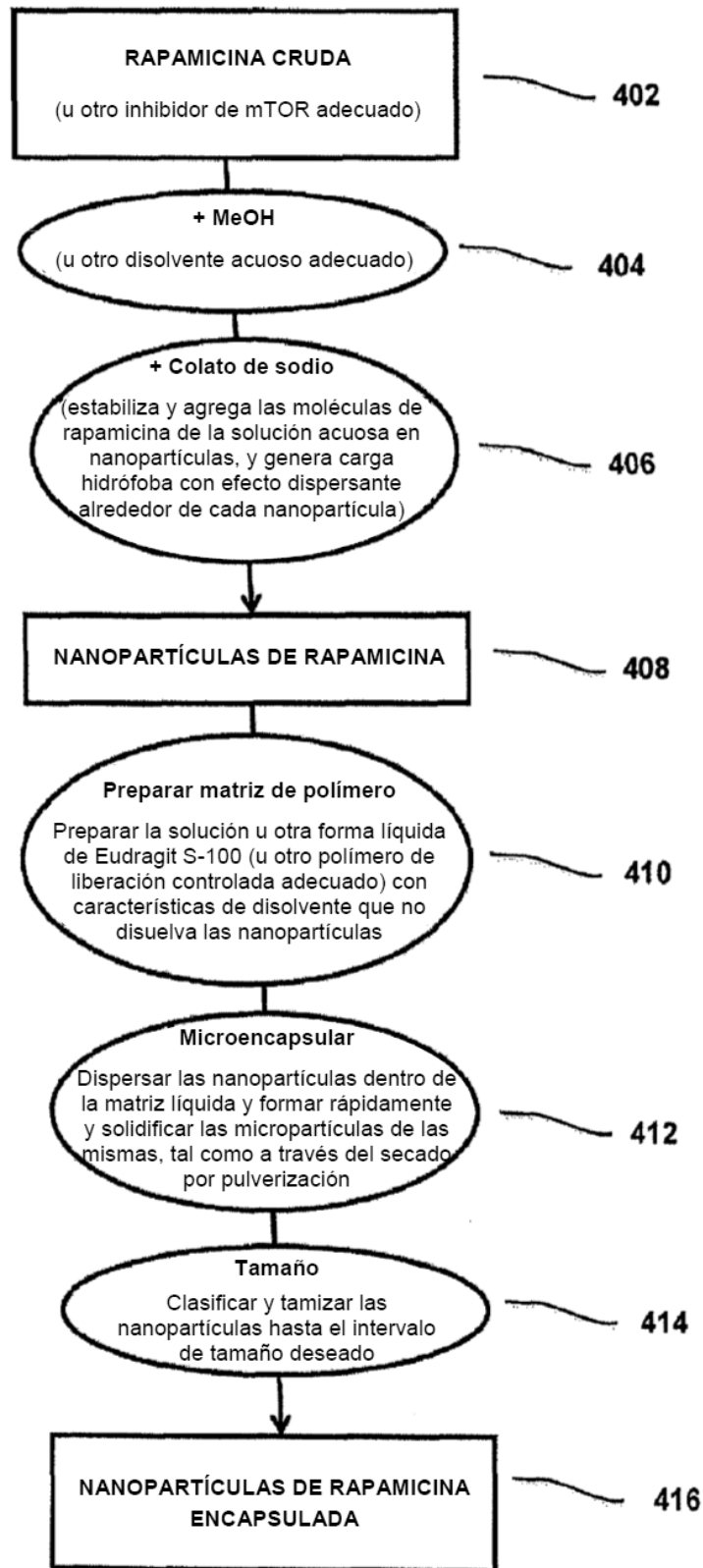


Figura 4A

Diagrama de flujo del procedimiento de nanopartículas de rapamicina en Eudragit S-100 (Escala 20 g)

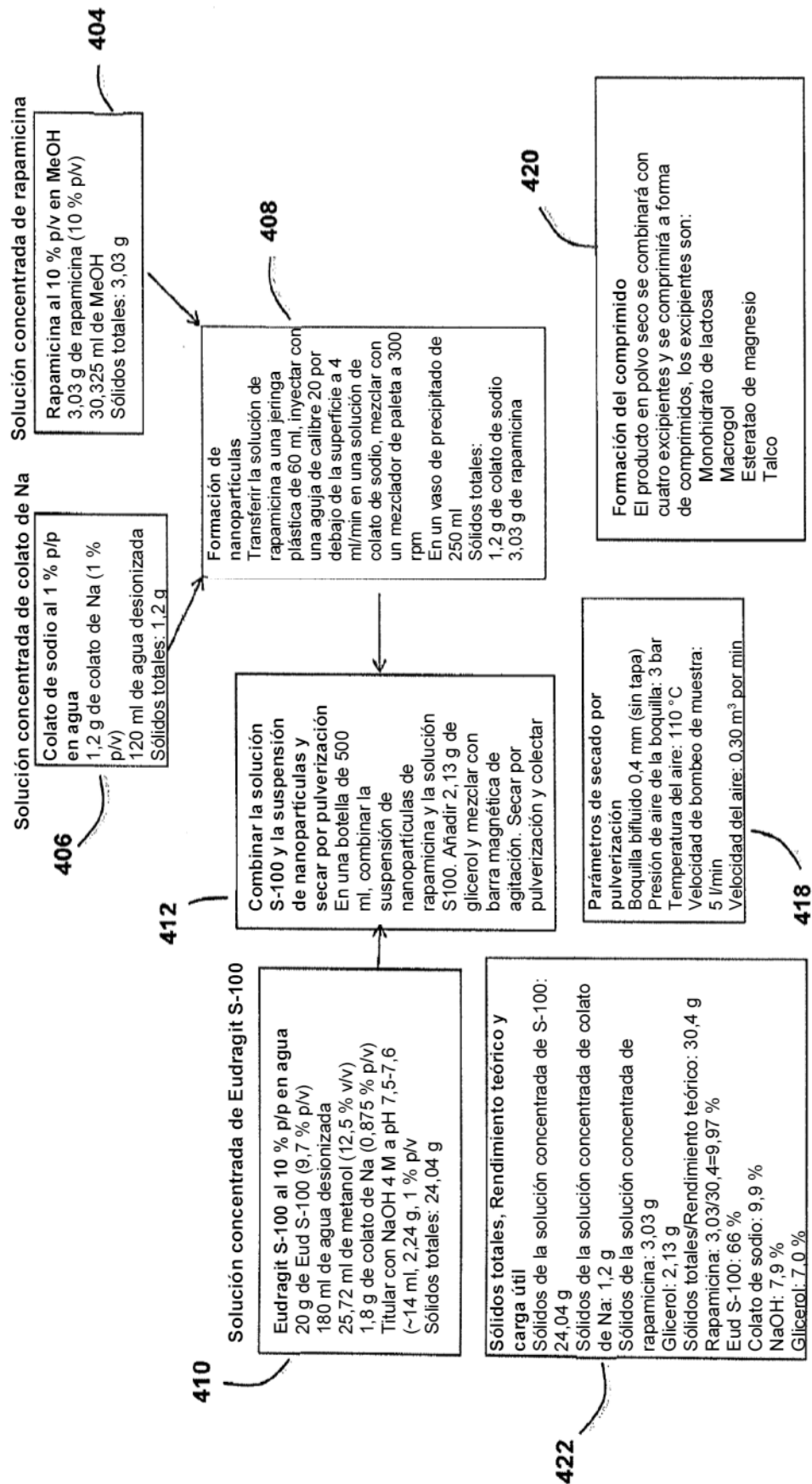


Figura 4B

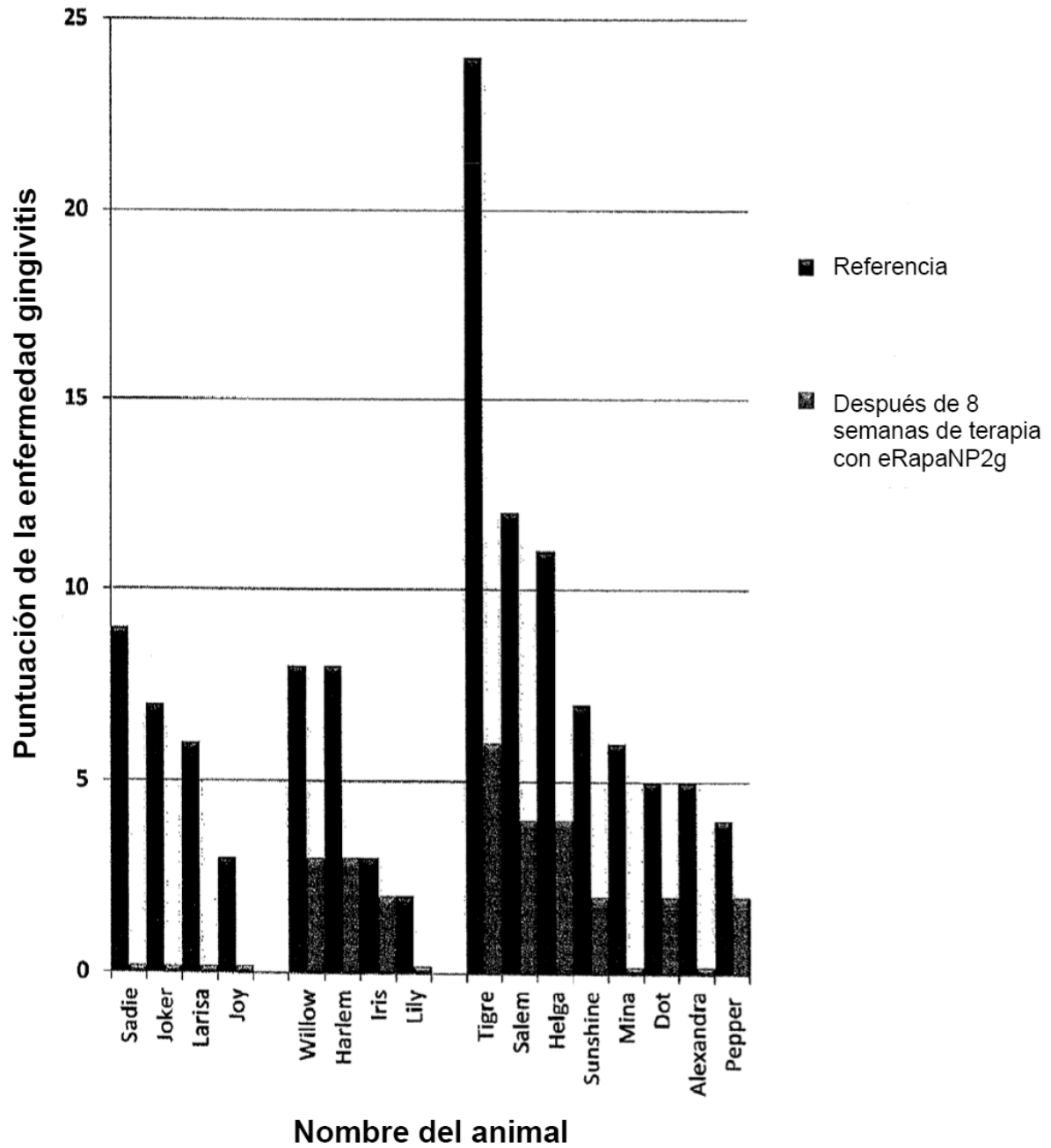
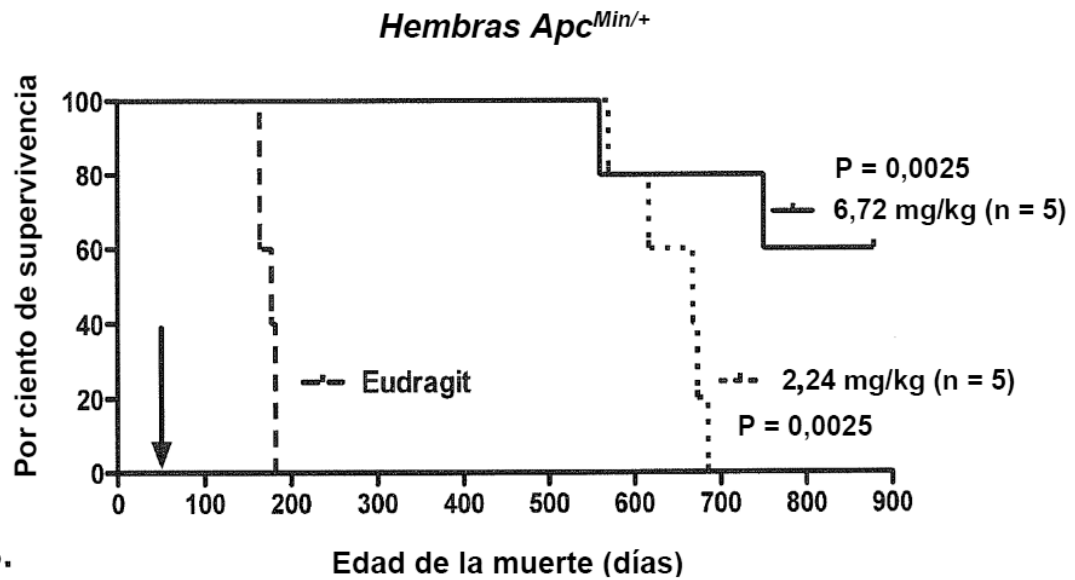
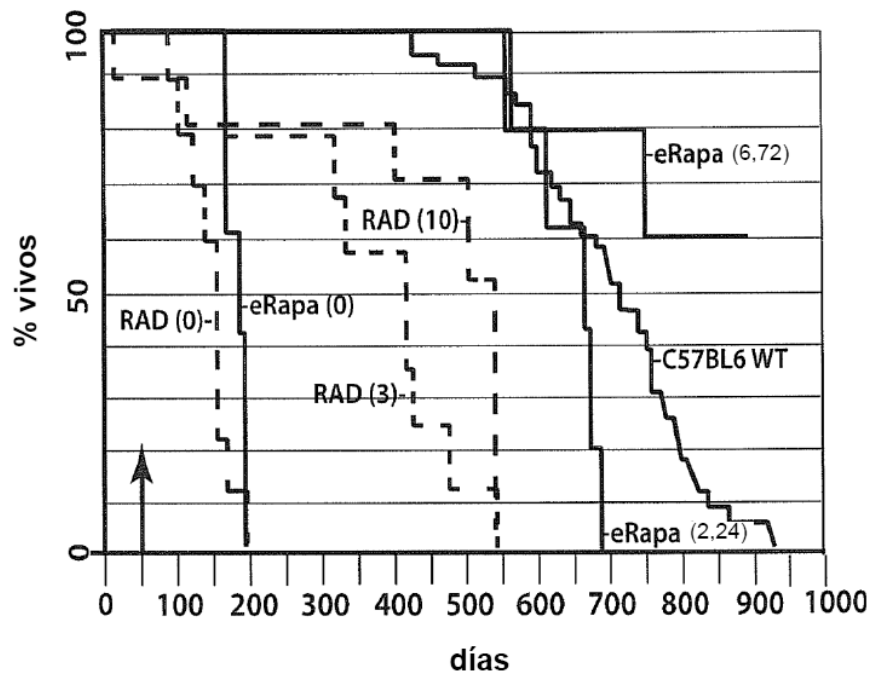


Figura 5

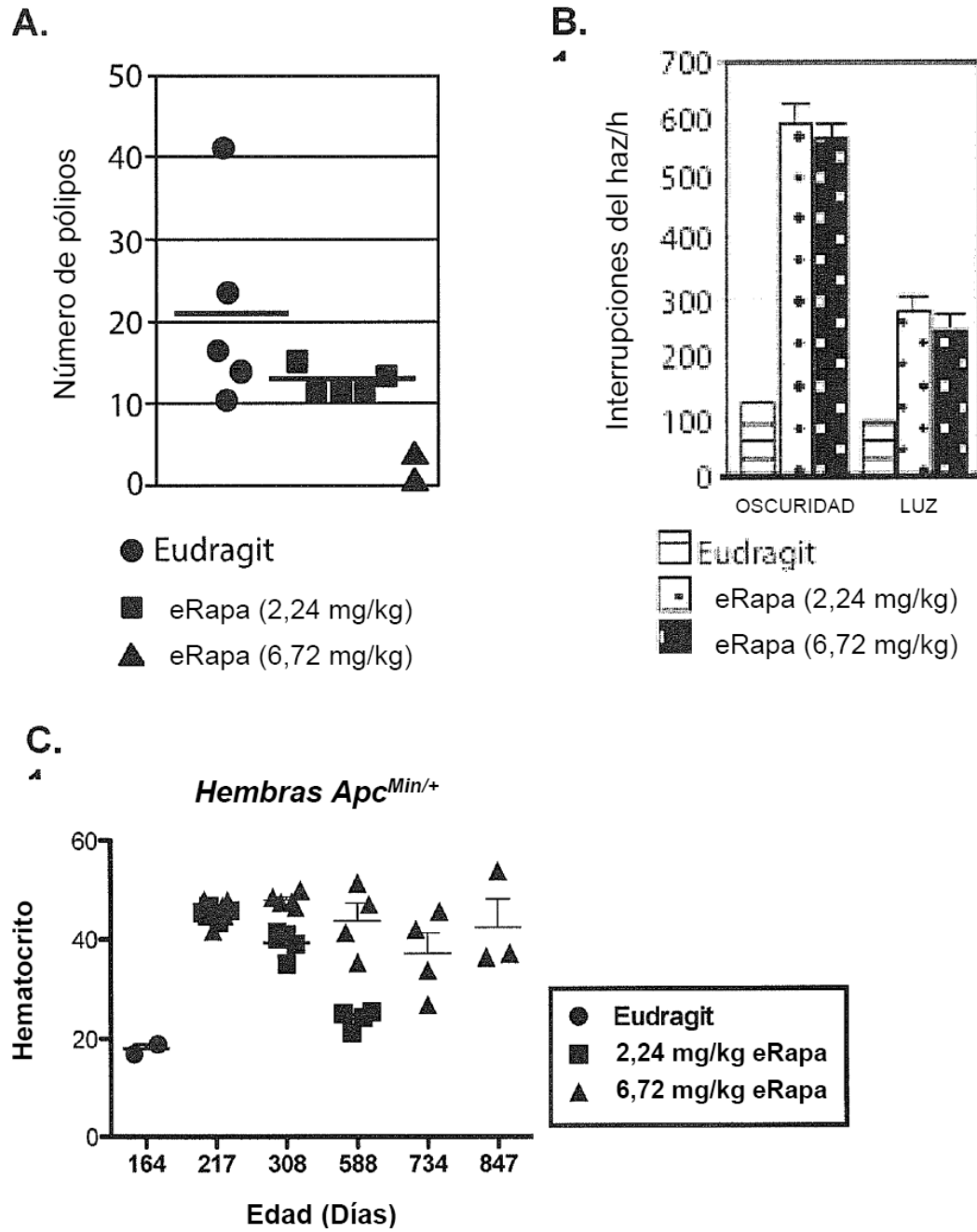
A.



B.

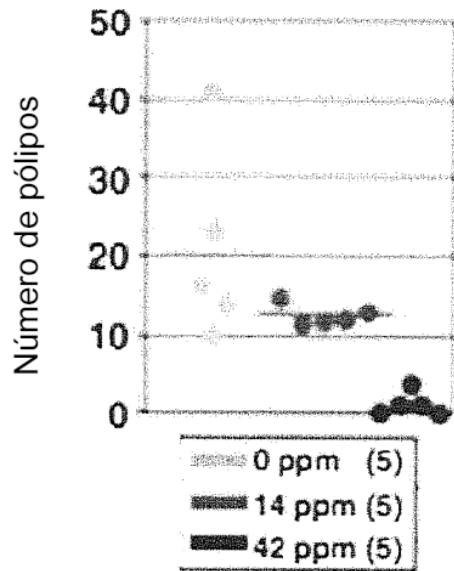


Figuras 6A-6B

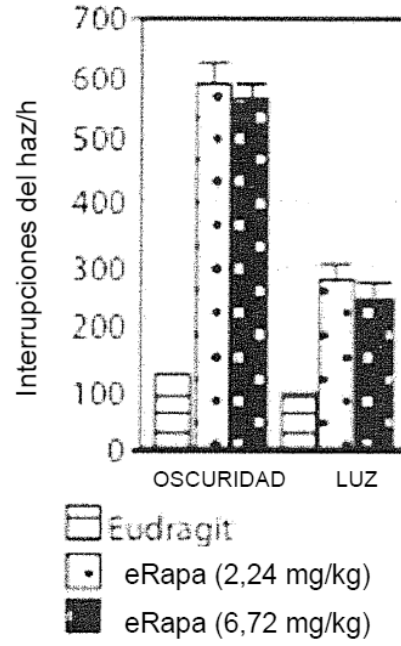


Figuras 7A-7C

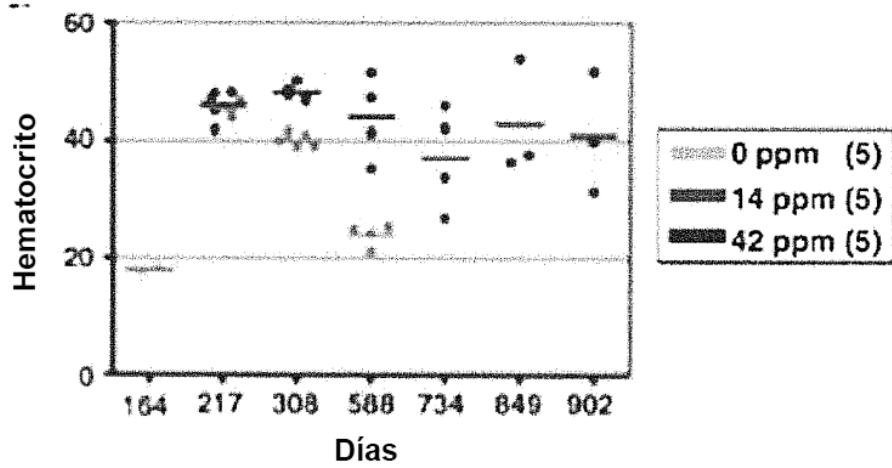
A.



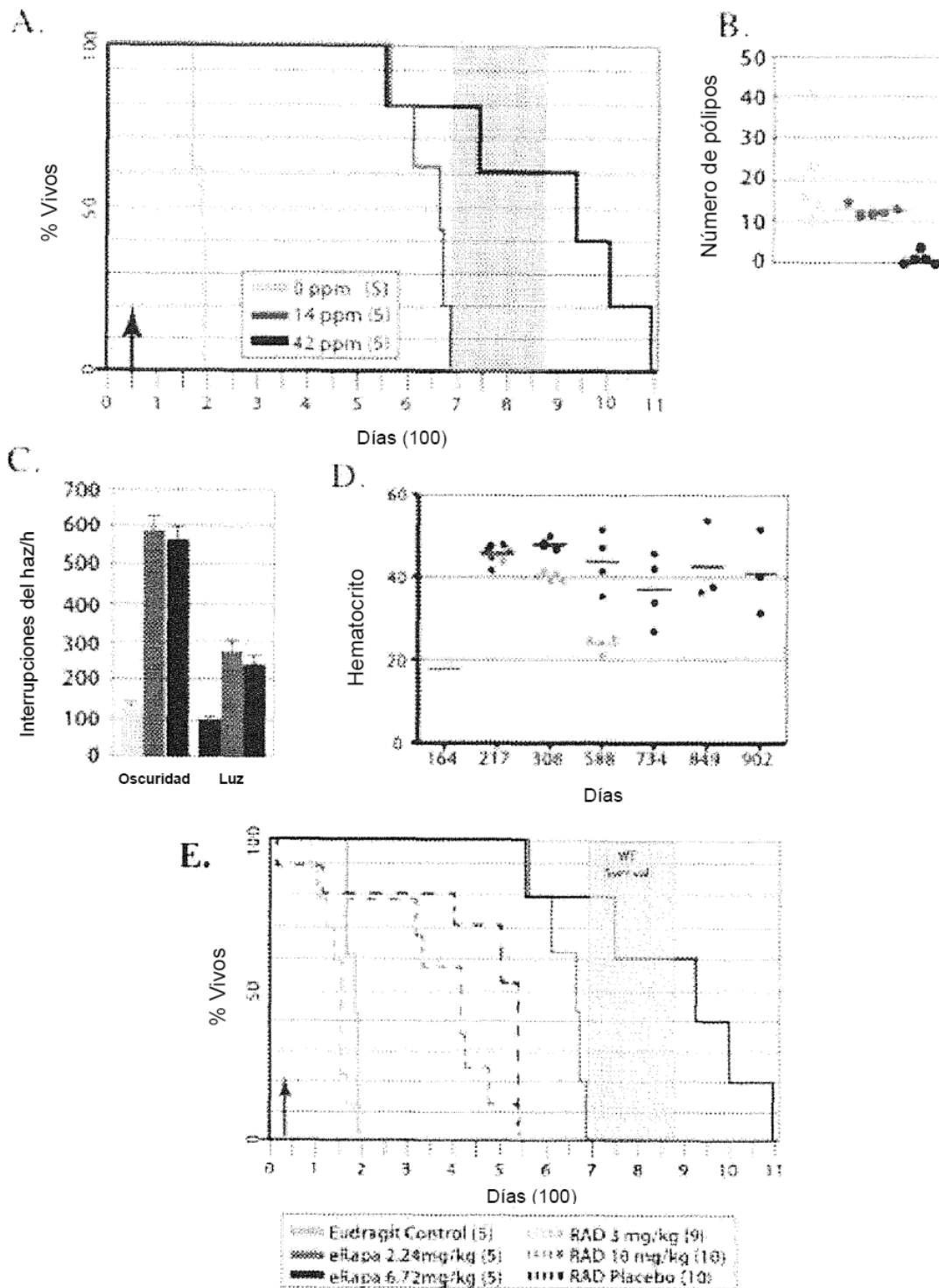
B.
1



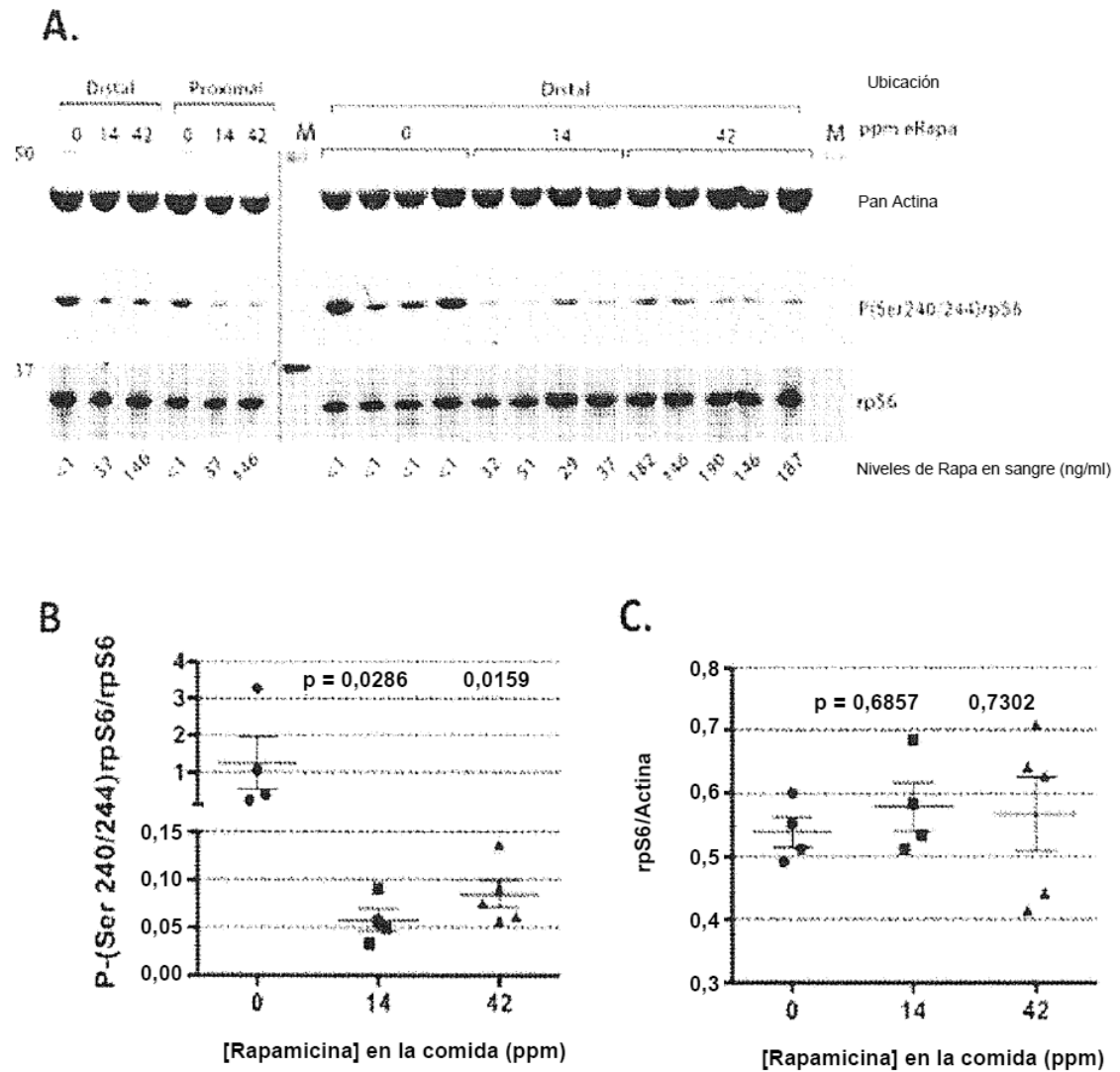
C.
1



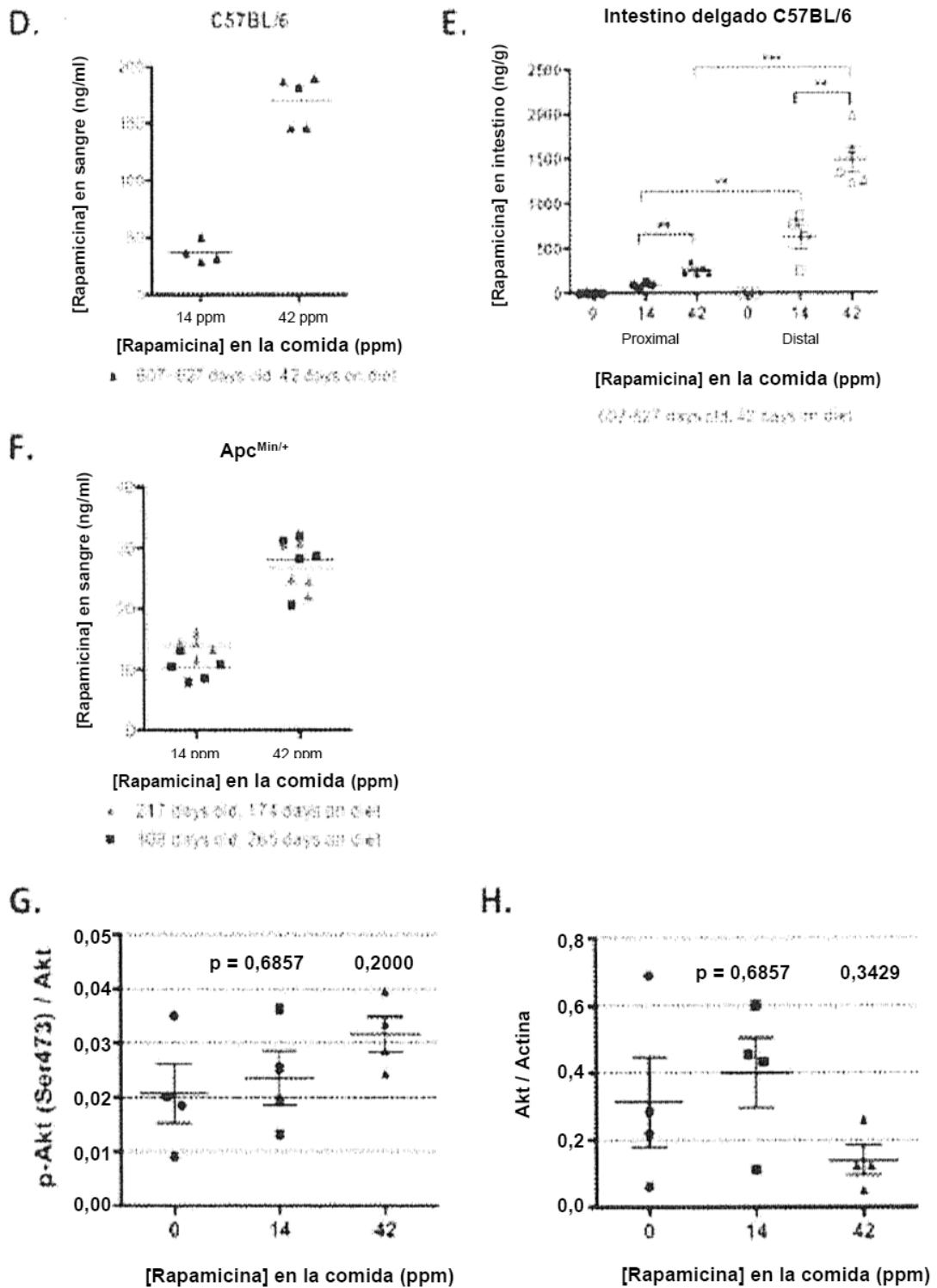
Figuras 8A-8C



Figuras 9A-9E



Figuras 10A-10C



Figuras 10D-10H

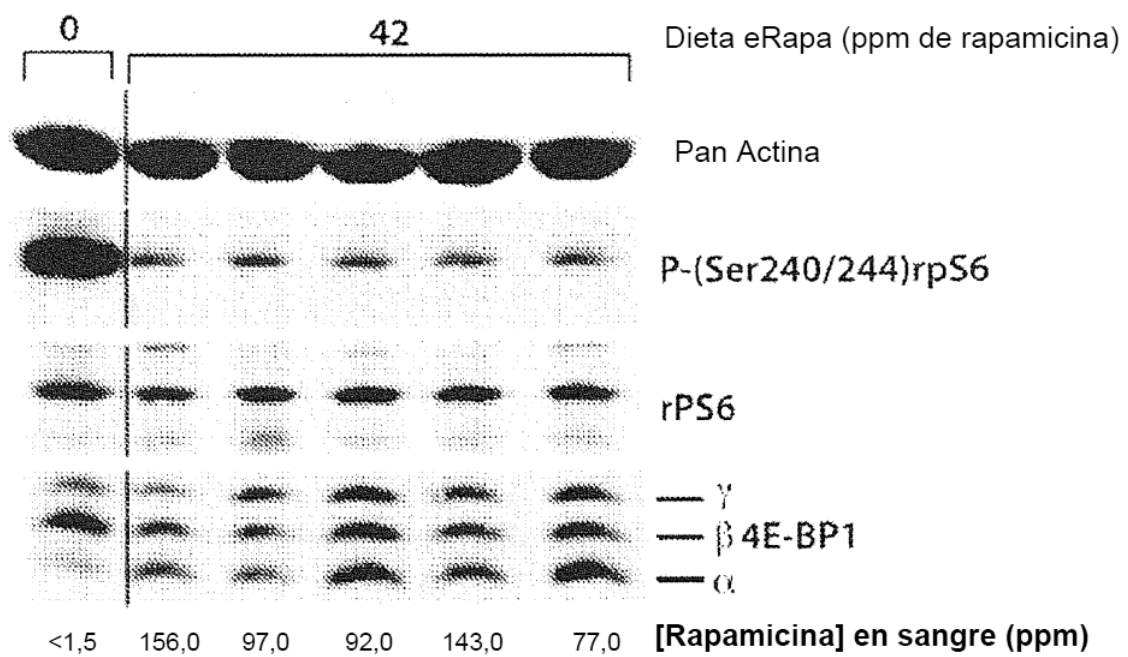
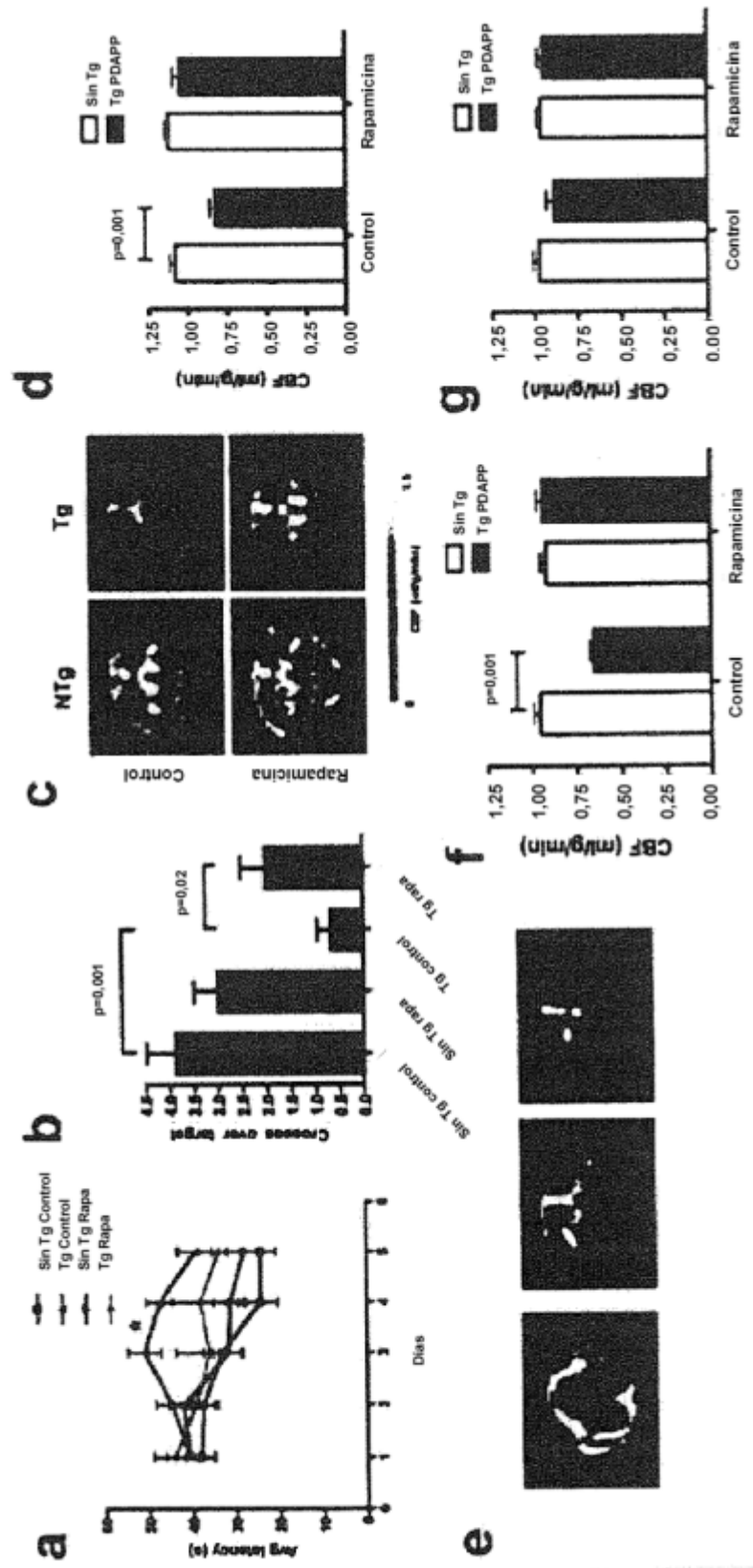
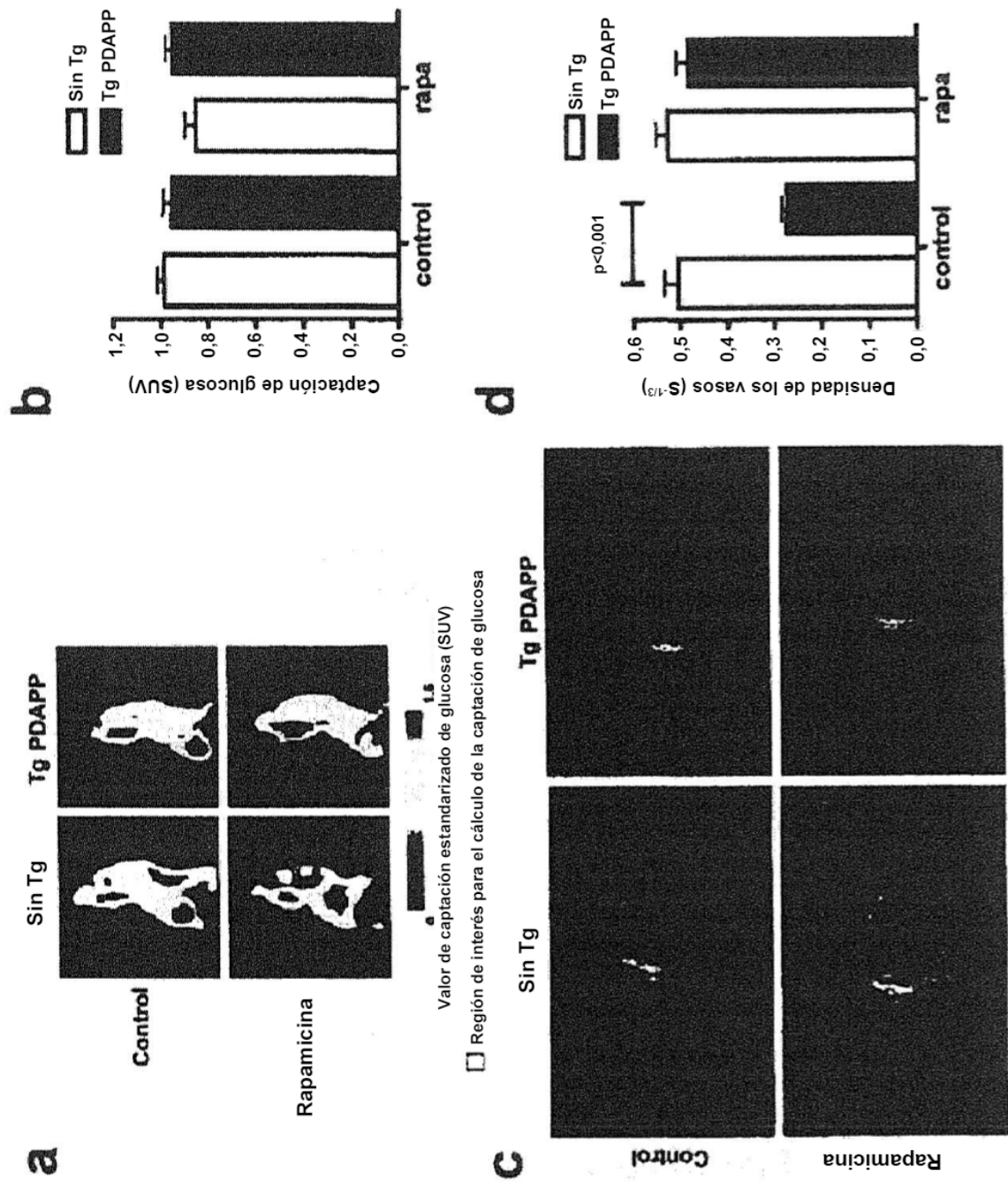


Figura 11



Figuras 12A-12G



Figuras 13A-13D

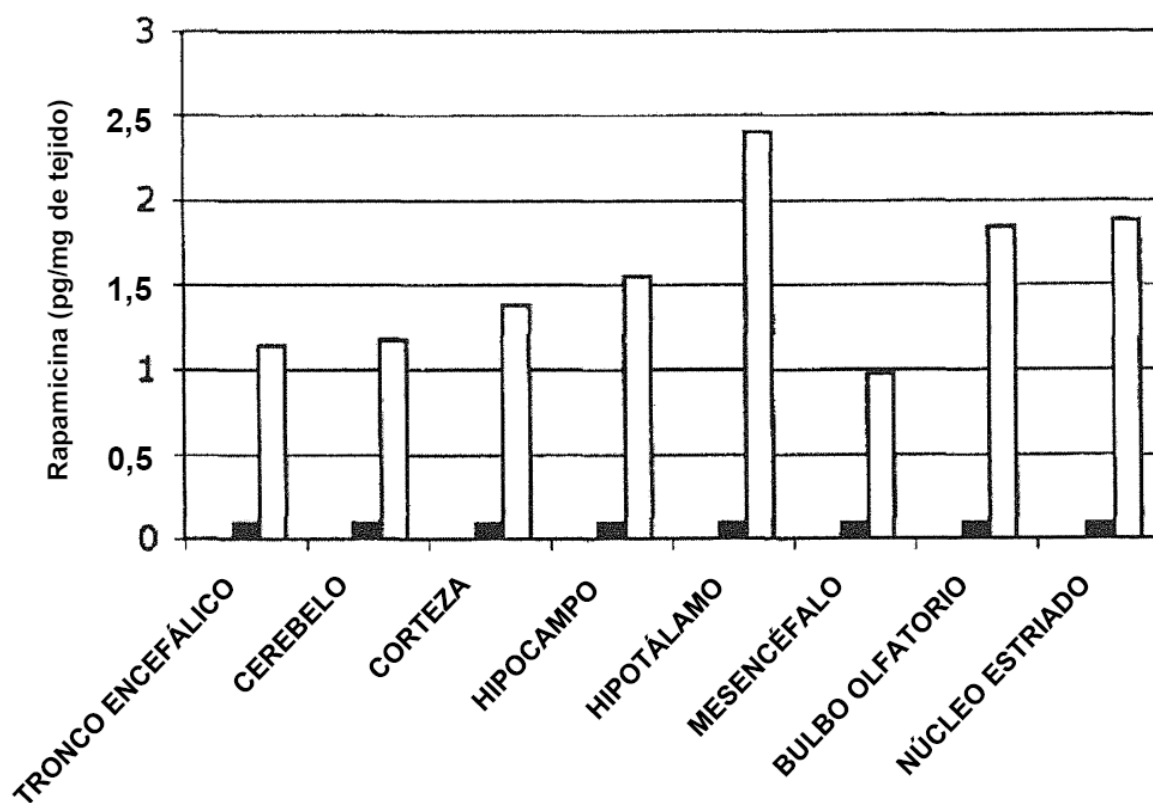


Figura 14