



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 646**

51 Int. Cl.:
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03727053 .5**
96 Fecha de presentación : **16.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1503796**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Composiciones y métodos para administrar fármacos fotosensibles.**

30 Prioridad: **16.05.2002 US 381474 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2010

73 Titular/es: **QLT Inc.**
887 Great Northern Way
Vancouver, British Columbia V5T 4T5, CA

72 Inventor/es: **Allemann, Eric;**
Konan, Yvette;
Gurny, Robert y
Boch, Ronald, Erwin

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 341 646 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

Composiciones y métodos para administrar fármacos fotosensibles.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo de la terapia fotodinámica (PDT), y en particular a unas composiciones y métodos para la administración local o parenteral de porfirinas verdes. Se proporcionan unas composiciones de nanopartículas biodegradables que contienen unos polímeros de poliéster para administrar porfirinas verdes como agente activable en la PDT. También se proporcionan unos métodos para la preparación y uso de tales composiciones de nanopartículas.

Técnica anterior

La terapia fotodinámica (PDT) es un proceso en dos etapas. Primero, se administra un agente o fármaco fotoactivable (denominado "fotosensibilizador" o "PS" de manera intercambiable en la presente memoria) bien sistémicamente o localmente. A continuación tras un intervalo apropiado, tiempo en el que el fármaco fotoactivable se acumula en un tejido diana más que en un tejido no diana, se aplica radiación con radiación electromagnética, como la luz visible (no térmica) a una zona de tratamiento durante un período de tiempo corto. Durante el tiempo de radiación el fármaco actúa como fotosensibilizador catalítico, que absorbe un fotón y que transfiere esta energía al oxígeno. Este proceso convierte el oxígeno molecular benigno estable disponible en oxígeno en estado singlete citotóxico u otra especie de oxígeno tóxico, que mata las células diana o modifica o modula la actividad celular en ellas. La PDT se utiliza ampliamente en el tratamiento del cáncer, y en determinadas enfermedades oftálmicas caracterizadas por la neovascularización en el ojo, por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Visudyne® (Novartis Ophthalmics, Inc.), que contiene un fotosensibilizador de porfirina verde, verteporfina, está aprobado en muchos países para el tratamiento de la neovascularización coroidea y la AMD.

Aunque muchos fotosensibilizadores son hidrófobos o insolubles en agua, a menudo resultan necesarios en medios acuosos o basados en agua en los que se encuentran las células diana. Así pues, se han desarrollado múltiples sistemas como vehículos de administración para tales agentes. Preferentemente, se fabrican vehículos para la administración farmacéuticamente aceptables de fotosensibilizadores de manera simple y rentable, a la vez que se mantienen las propiedades de administración eficaz del fármaco.

Las nanopartículas son partículas coloidales sólidas formadas por la asociación de polímeros adecuados. Las nanopartículas son producidas por medios mecánicos o químicos y pueden formularse para contener una sustancia activa como un fármaco hidrófobo en asociación con los polímeros. De esta manera las nanopartículas proporcionan una alternativa a otros portadores coloidales como los liposomas, micelas, niosomas (vesículas surfactantes no iónicas), y microemulsiones.

Los polímeros sintéticos utilizados en la preparación de nanopartículas incluyen poliésteres como el ácido (poli) láctico, copolímero de láctido y glicólido y poli(ϵ -caprolactona) (patente U.S. n° 4.968.350). Las nanopartículas suelen prepararse utilizando uno de los siguientes métodos: técnica de evaporación de la emulsión, técnica del desplazamiento del disolvente, técnica de emulsificación-difusión y técnica de la purificación salina. Estas técnicas son similares en lo referente a que implican una solución orgánica que contiene los componentes de nanopartículas y un componente acuoso que contiene estabilizadores que actúa como medio de dispersión para las nanopartículas.

Se han investigado ampliamente las partículas biodegradables basadas en polímeros de poliéster como el copolímero de D,L-láctido y glicólido (PLGA) y el polímero de D,L-láctido (PLA) como sistemas de administración parenteral (Allémann *et al.*, 1.998; Kawashima *et al.*, 1.998; Rodrigues Jr *et al.*, 1.995; Scholes *et al.*, 1.993; Smith *et al.*, 1.986). Los polímeros de poliéster, aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos, resultan de interés debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas (Vert 1.987; Vert *et al.*, 1.998). Se han utilizado las nanopartículas para modificar la farmacocinética de los fármacos, como se detalla en los siguientes: Roland, Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in hepatoma patients after a single intravenous injection of free or nanoparticles bound anthracycline, *Int. J. Pharm.*, 54:113(1.989); J. Kattan, J.P. Droz, P. Couvreur, J.P. Marino, A.B. Laroze, P. Rougier, P. Brault, H. Vranckx, J. M. Grognet, X. Morge and H. Sancho-Carnier, Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles, *Invest. New Drugs*, 10:191 (1.992); H.S. Yoo, J.E. Oh, T.G. Park, Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release, *Pharm. Res.*, 16: 1114 (1.999); E. Allémann, R. Gurny, E. Doelker, F.S. Skinner, H. Schutz, Distribution, kinetics and elimination of radioactivity after intravenous and intramuscular injection of ¹⁴C-savoxepine loaded poly(D,L-lactic acid) nanospheres to rats, *J. Controlled Release* 29: 97-104 (1.994); R. Jalil, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) polymers in sustained drug delivery, *Drug Dev. Ind Pharm.*, 16:2353 (1.990), C. Tasset; N. Barette; S. Thysman; J.M. Ketelslegers; V. Preat *et al.*, Polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles as sustained release system for calcitonin, *J. Control. Rel.*, 33: 23 (1.995); T. Harmia; P. Speiser, J. Kreuter, Nanoparticles as drug carriers in ophthalmology, *Pharm. Acta. Helv.*, 62: 322(1987); and M. El-Samaly; P. Rohdewald, Triamcinolone diacetate nanoparticles, sustained release drug delivery system suitable for parenteral administration *Pharm. Acta. Helv.*, 57(7): 201-4 (1.982).

Tradicionalmente, las nanopartículas biodegradables han servido como depósitos de fármacos inmovilizados que se liberan lentamente de la matriz del polímero. Se creía que esto era un efecto de una degradación lenta del polímero

para resultar en una liberación lenta del fármaco a lo largo del tiempo. Por ejemplo, las inyecciones intramusculares en mujeres de microcápsulas inyectables de acción prolongada compuestas por copolímero de D,L-láctido y glicólido que contenían contraceptivos proporcionaban una liberación controlada (Beck LR *et al.*, A. J. Obstet. Gynecol. 147, 815-821, 1.983). Además, se creía que las nanopartículas de doxorubicina se depositaban en un reservorio intrahepático y se liberaban lentamente al administrarse en nanopartículas de poliisohexilcianoacrilato y polimetacrilato (Kattan J. *et al.*, Investigational New Drugs, 10, 191-199, 1.992, Rolland A International Journal of Pharmaceutics, 54, 113-121, 1.989).

Para la administración parenteral, las formulaciones de nanopartículas deben satisfacer los requisitos farmacopeicos de esterilidad. Sin embargo, la esterilización de tales dispositivos poliméricos mediante una técnica satisfactoria sigue siendo un reto. La labilidad química o física de la matriz del polímero suele limitar los métodos más convencionales para obtener unos productos estériles aceptables. Por ejemplo, la esterilización mediante autoclavado puede inducir la degradación de los poliésteres y el fármaco por hidrólisis. Estos polímeros también son sensibles al calor debido a su naturaleza termoplástica (Athanasίου *et al.*, 1.996). La esterilización química mediante gases como el óxido de etileno puede resultar en problemas de toxicidad a residuos tóxicos. Numerosos estudios han demostrado los efectos de la radiación γ en la estabilidad y la seguridad de los portadores coloidales basados en poliésteres, principalmente las micropartículas (Hausberger *et al.*, 1.995; Mohr *et al.*, 1.999; Montanari *et al.*, 1.998; Volland *et al.*, 1.994). Se demostró que la radiación gamma alteraba las propiedades de las micropartículas de poliéster cargadas con el fármaco de varias maneras como las reacciones radiolíticas, escisión de cadenas y reticulación (Volland *et al.*, 1.994). Estas reacciones pueden tener consecuencias en el contenido nominal de fármaco, el patrón de liberación del fármaco y la bioresorción del sistema. Además, el fármaco encapsulado puede degradarse tras la exposición a radiación gamma. Por tanto, la selección de un método de esterilización adecuado para ese tipo de formulaciones resulta crucial para asegurar su integridad física y química, su rendimiento y seguridad *in vivo*.

Como técnica alternativa, se ha utilizado la filtración estéril a través de filtros de membrana de $0,22 \mu\text{m}$ para materiales químicamente o térmicamente sensibles puesto que no tiene ningún efecto adverso en el polímero y el fármaco. La presencia de partículas con tamaños por encima del "cutoff" de la membrana de esterilización, sin embargo, tiende a resultar en una obstrucción de la membrana y una disminución de la eficacia de filtración. Resultaría ventajoso contar con métodos para la preparación de nanopartículas con un tamaño medio significativamente por debajo del "cutoff" de la membrana de esterilización y con una distribución de tamaño reducida para evitar la obstrucción de la membrana. La capacidad de producir nanopartículas en el intervalo de tamaño de 100-150 nm resultaría atractiva para los sitios diana situados fuera del sistema vascular. Algunos tumores, que poseen una microvasculatura deficiente, muestran una permeabilidad vascular aumentada que favorece la accesibilidad de los portadores coloidales a las células tumorales extravasculares (Douglas *et al.*, 1.987).

WO 97/10 811 describe unas nanopartículas para su uso en la terapia fotodinámica, nanopartículas que comprenden un complejo de ftalocianina de cinc.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona unas nanopartículas cargadas con una porfirina verde que inesperadamente liberan la porfirina verde rápidamente una vez que se introducen las nanopartículas en un ambiente que contiene proteínas séricas, por ejemplo, el torrente sanguíneo de un sujeto humano sometido a un tratamiento de terapia fotodinámica (PDT). Esta observación contrasta con los usos anteriores de nanopartículas para la liberación controlada, o retardada, de los ingredientes activos de las nanopartículas. Las nanopartículas de la invención también son lo suficientemente pequeñas para permitir una esterilización eficaz mediante un proceso de filtración.

La presente invención proporciona de esta manera unos métodos para la producción de unas nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador de un tamaño medio de partícula inferior a aproximadamente 220 nm, opcionalmente inferior a 200 nm, de diámetro para posibilitar la esterilización mediante un proceso de filtración. Las nanopartículas de la presente invención también son lo suficientemente estables para soportar la liofilización y la reconstitución en un medio acuoso para la administración.

La invención proporciona una composición que comprende unas nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador que comprenden una o más porfirinas verdes y uno o más polímeros de poliéster.

En las formas de realización preferentes, los polímeros son el copolímero de D,L-láctido y glicólido, también denominado PLGA, y/o el polímero de D,L-láctido, también denominado PLA. En otra forma de realización, las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador se encuentran en forma liofilizada. En una forma de realización preferente, las nanopartículas son estables tras la liofilización y tras la reconstitución en un medio acuoso.

En las formas de realización preferentes, las porfirinas verdes son verteporfina, QLT 0069 ó QLT 0074. Por supuesto, las porfirinas verdes se utilizan preferentemente en combinación con PLGA y/o PLA en la práctica de la invención.

El descubrimiento sorprendente de que las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador liberaban rápidamente el fotosensibilizador (en unos pocos segundos) tras ser expuestas a un medio que contenía suero proporciona un fundamento para el uso de las nanopartículas como vehículo de administración para los fotosensibilizadores. Como en-

tenderá la persona experta, la liberación controlada del fotosensibilizador no resulta deseable en un ámbito clínico o en otro ámbito terapéutico, donde deba evitarse un estado continuado de fotosensibilización, producido por una liberación lenta del fotosensibilizador, para evitar efectos secundarios indeseables. Se han utilizado anteriormente nanopartículas que contenían compuestos terapéuticos para la liberación controlada de compuestos terapéuticos a diferencia de la liberación rápida.

La administración de las nanopartículas es seguida de la activación del fotosensibilizador tras su rápida administración a los tejidos o células diana. La administración se realiza preferentemente por medios parenterales como la inyección intravenosa, pero sin limitarse a ella.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación esquemática del proceso de preparación de las nanopartículas.

La Figura 2 es un gráfico que muestra las trazas de base temporal superpuestas que muestran la liberación de la verteporfina de las nanopartículas cargadas con verteporfina. En $t = 60$ s, se inyectaron $200 \mu\text{L}$ de FBS; en $t = 240$ s, se inyectaron $20 \mu\text{L}$ de Tritón/5DW v/v al 10%.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la fluorescencia cutánea en ratones hembra SKH1 tras la administración de una dosis intravenosa de $1,4 \mu\text{mol/kg}$ de nanopartículas PLGA con verteporfina.

La Figura 4 son unos gráficos que muestran la fotosensibilidad cutánea inducida por las nanopartículas cargadas con verteporfina administradas intravenosamente, expuesta a luz de un simulador solar, y puntuadas 1 y 3 días después de la inyección. La dosis intravenosa de verteporfina fue de $1,4 \mu\text{mol/kg}$; la dosis de luz fue de 60 J/cm^2 . Las barras de error indican la desviación estándar en base a cuatro ratones por grupo.

Modos de llevar a cabo la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento sorprendente de que las nanopartículas que contenían un fotosensibilizador liberaban rápidamente el fotosensibilizador (entre unos pocos segundos a unos minutos) tras ser expuestas a un medio que contenía suero. Se cree que este es el primer caso de una composición de nanopartículas que ha demostrado liberar un compuesto terapéutico a los pocos segundos de exposición al suero. El hecho de que tales nanopartículas liberen el fotosensibilizador rápidamente hace práctico utilizar nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador para administrar un fotosensibilizador a un sujeto sometido a PDT. En la PDT, resulta muy deseable utilizar una formulación que libere el fotosensibilizador rápidamente de manera que pueda tener una activación máxima, pueda acumularse en el tejido diana a los pocos minutos de la administración, y a continuación se elimine rápidamente del sujeto tras la activación del fotosensibilizador mediante la administración de luz. Esto evita las complicaciones de una fotosensibilidad cutánea prolongada observada en situaciones donde las concentraciones del fotosensibilizador permanecen a lo largo de un período prolongado. Sin restringirse a la teoría, y ofrecido en beneficio de mejorar la comprensión de la invención, la combinación de una porfirina verde y un polímero de poliéster en una nanopartícula puede desestabilizar la nanopartícula de manera que libere fácilmente la porfirina verde después de entrar en contacto con el suero. Esta liberación puede darse en forma de una transferencia del fotosensibilizador de la nanopartícula a las lipoproteínas en el suero.

De manera alternativa, y nuevamente sin restringirse a la teoría, la liberación rápida de la porfirina verde puede deberse al tamaño por debajo de 220 nm de las nanopartículas de la invención, que puede facilitar la dispersión del fotosensibilizador. Esto puede sugerir que el fenómeno de liberación rápida sería aplicable en general a ingredientes activos o agentes farmacéuticos además de los fotosensibilizadores.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término nanopartículas incluye nanosferas, compuestas por una estructura tipo matriz polimérica, y nanocápsulas, compuestas por una cubierta de polímero que rodea un núcleo líquido. La "liberación rápida" del fotosensibilizador (PS) de una preparación de nanopartículas que las contiene se refiere a la capacidad de una nanopartícula que contiene un PS de liberar o administrar el PS aproximadamente a los 5 minutos después de entrar en contacto con un medio que contiene suero. Preferentemente, la liberación de más del 50% del PS se da en menos de 5 minutos tras el contacto, más preferentemente en menos de aproximadamente 4 minutos, menos de aproximadamente 3 minutos, menos de aproximadamente 2 minutos, menos de aproximadamente 60 segundos, o menos de aproximadamente 30 segundos. En otras formas de realización de la invención, la cantidad de PS liberado puede ser más del 60% o más del 70% del PS presente en la nanopartícula. Los fotosensibilizadores y los polímeros que forman las nanopartículas para la práctica de la invención se proporcionan más adelante. "Porfirinas verdes" se refiere a derivados de porfirinas obtenidos haciendo reaccionar un núcleo de porfirina con un alquino en una reacción tipo Diels-Alder para obtener una mono-hidrobenzoporfirina.

La invención también proporciona unos métodos para la formulación de nanopartículas que contienen PS como se describe más adelante. Los métodos descritos incluyen el descubrimiento de unos medios para preparar nanopartículas de un tamaño pequeño de manera predecible y de una uniformidad relativa (en la distribución de tamaño) de manera que las nanopartículas puedan esterilizarse fácilmente mediante filtración, como a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. Las nanopartículas preferentes de la invención tienen un tamaño medio de partícula inferior a aproximadamente 200 nm , más preferentemente inferior a o de aproximadamente 190 nm , inferior a o de aproximadamente 180 nm , inferior

a o de aproximadamente 170 nm, inferior a o de aproximadamente 160 nm, inferior a o de aproximadamente 150 nm, inferior a o de aproximadamente 140 nm, o inferior a o de aproximadamente 130 nm de diámetro. El uso de “diámetro” no indica que las nanopartículas de la invención tengan necesariamente una forma esférica. En cambio el término se refiere a la anchura media aproximada de las nanopartículas como se describen en la presente memoria.

5 Las nanopartículas de la invención también pueden deshidratarse para una mayor estabilidad y mejor almacenamiento. Los medios preferentes de deshidratación incluyen el secado por congelación o liofilización, aunque pueden utilizarse otros métodos. Opcionalmente, se incluye un lioprotector como aditivo en las nanopartículas de la invención para mejorar la estabilidad durante un proceso de liofilización. Tales aditivos pueden servir adicionalmente para mejorar la rehidratación (o redispersión) de las nanopartículas liofilizadas antes de su uso.

15 Las nanopartículas que contienen el fotosensibilizador son un vehículo para administrar los fotosensibilizadores en aplicaciones conocidas en la técnica. Las aplicaciones preferentes de la invención incluyen usos terapéuticos, como la terapia fotodinámica (PDT) como se conoce en la técnica, donde la selección y la activación del fotosensibilizador son llevadas a cabo por la persona experta en combinación con el uso de nanopartículas para administrar el fotosensibilizador. Preferentemente, las nanopartículas se utilizan para administrar el fotosensibilizador a un fluido que contiene suero o a un tejido de un sujeto sometido a PDT.

20 *Polímeros para la fabricación de nanopartículas*

Ejemplos de polímeros adecuados para la formación de las nanopartículas de la invención incluyen un copolímero u homopolímero farmacéuticamente aceptable de monómeros seleccionados de entre el grupo que consiste en L-láctido N ó S; D-láctido S; D,L-láctido S; glicólido S; ó carbonato trimetileno. Tales polímeros son comercializados por MEDISORB (marca registrada de Medisorb Technologies Inc.) PURASORB (marca registrada de PURAC Biochem) ó RESOMER (marca registrada de Boehringer Ingelheim, Alemania). Los polímeros MEDISORB adecuados son aquellos de las series L ó DL, como 100 L ó DL, ó 8515, 7525, 6535 ó 5050 DL; los homopolímeros RESOMER para su uso en la invención son aquellos de las series L, formados a partir de L láctido, como L 210 ó 214 ó L 210 S; las series R formadas a partir de D,L-láctido racémico, como R 104, 202, 203, ó 206-208; las series G formadas a partir de glicólido, como G 205; copolímeros de las series LR formados a partir de L-láctido, como LR 706 ó 708; ó DL-láctido con glicólido, como RG 502H ó 503H.

Donde se deseen otros modos de administración, como la administración tópica, una persona experta puede seleccionar fácilmente otros polímeros adecuados para la formación de nanopartículas sin excesiva experimentación.

35 Un polímero que resulta adecuado para la formación de nanopartículas de acuerdo con la invención es el ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), poli(ϵ -caprolactona).

La Tabla 1 proporciona una lista de polímeros que resultaron ser particularmente adecuados para la producción de nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador.

45

Tabla 1. Polímeros de poliéster utilizados para la preparación de nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador		
Polímero	Relación PLA/PGLA	Peso molecular
RG502	50/50	12.000
RG502H	50/50	12.000
RG504H	50/50	48.000
RG752	75/25	12.000
RG755	75/25	63.000
RG756	75/25	98.000
R104	100	2.000
R202	100	16.000
R202H	100	16.000
R203	100	28.000

65

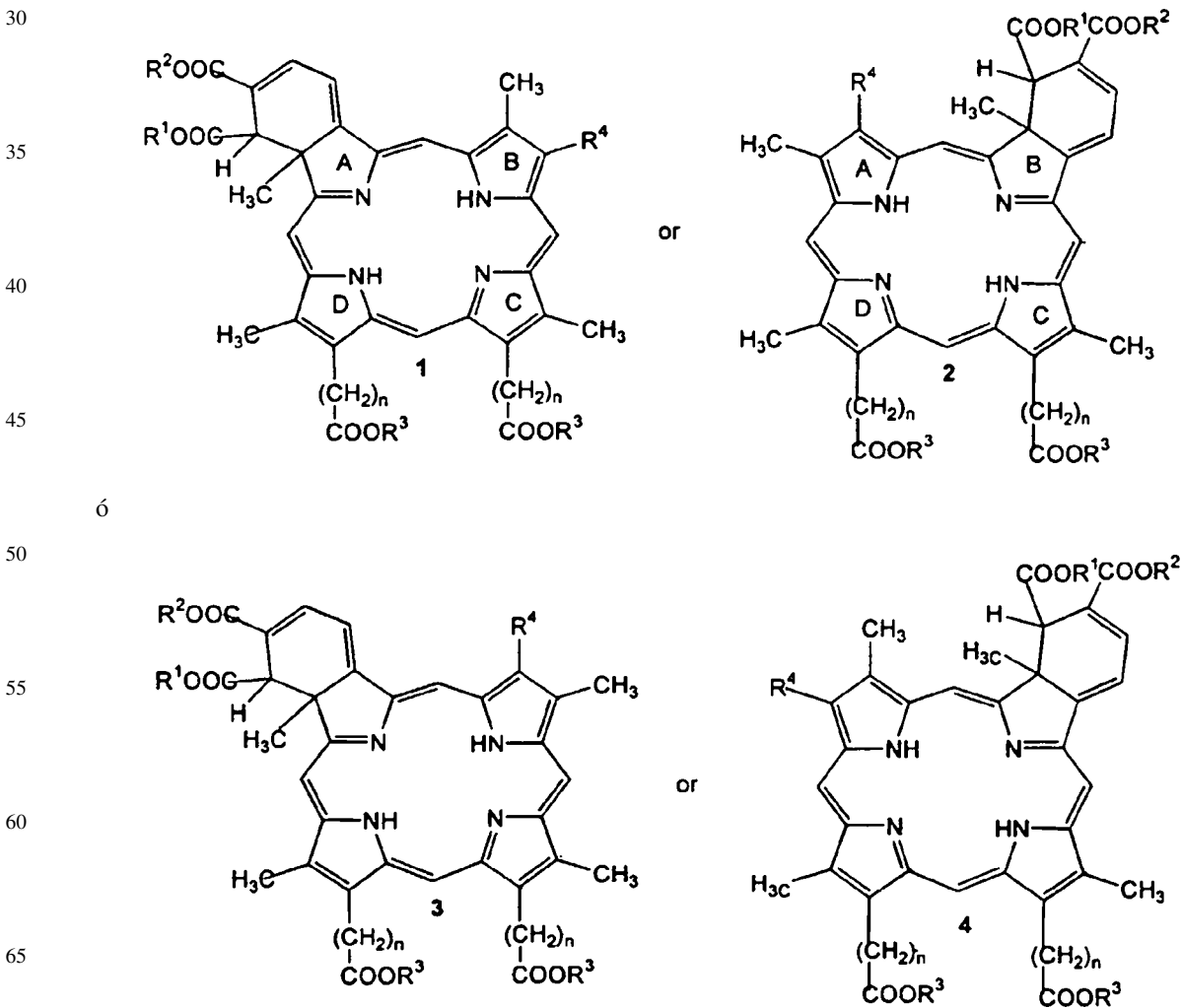
Fotosensibilizadores para su incorporación en las nanopartículas

Los fotosensibilizadores útiles para la invención son las porfirinas.

5 Ejemplos adicionales de fotosensibilizadores útiles en la invención incluyen las porfirinas verdes descritas en las patentes US n^{os} 5.283.255, 4.920.143, 4.883.790, 5.095.030, y 5.171.749; y los derivados de porfirinas verdes, comentados en las patentes US n^{os} 5.880.145 y 5.990.149. En las patentes anteriormente citadas se muestran varias estructuras de porfirinas verdes típicas, que también proporcionan detalles para la producción de los compuestos. Otros fotosintetizadores que pueden resultar útiles en la invención son los derivados de la porfirina Diels-Alder de fotosensibilización, descritos en la patente US n^o 5.308.608; compuestos similares a la porfirina, descritos en las patentes US n^{os} 5.405.957, 5.512.675, y 5.726.304; derivados de la bacterioclorofila A, descritos en las patentes US n^{os} 5.171.741 y 5.173.504. También pueden utilizarse formas diméricas de la porfirina verde y formas diméricas o multiméricas de las combinaciones porfirina verde/porfirina. Pueden prepararse dímeros y compuestos oligoméricos de la invención utilizando reacciones análogas a aquellas para la dimerización y oligomerización de las porfirinas *per se*. Las porfirinas verdes o uniones porfirina verde/porfirina pueden realizarse directamente, o pueden acoplarse porfirinas, seguido de una reacción Diels-Alder de cada porfirina terminal o ambas porfirinas terminales para convertirlas en las porfirinas verdes correspondientes. Por supuesto pueden utilizarse combinaciones de dos o más fotosensibilizadores en la práctica de la invención. Es preferible que el espectro de absorción del fotosensibilizador se encuentre en el rango visible, por lo general entre 350 nm y 1.200 nm, más preferentemente entre 400-900 nm, e incluso más preferentemente entre 600-900 nm.

Los fotosensibilizadores son las porfirinas verdes derivado monoácido de la benzoporfirina (BPD-MA), EA6 y B3 (patentes US 5.929.105 y 5.990.149, respectivamente). El BPD-MA, por ejemplo, es lipófilo y un potente fotosensibilizador. El BPD-MA es un candidato preferente para su uso en la invención, pero también pueden utilizarse otros BPDs como el EA6 (también conocido como QLT 0074) y el B3, QLT 0069 u otros derivados.

Las porfirinas verdes preferentes tienen la estructura básica:

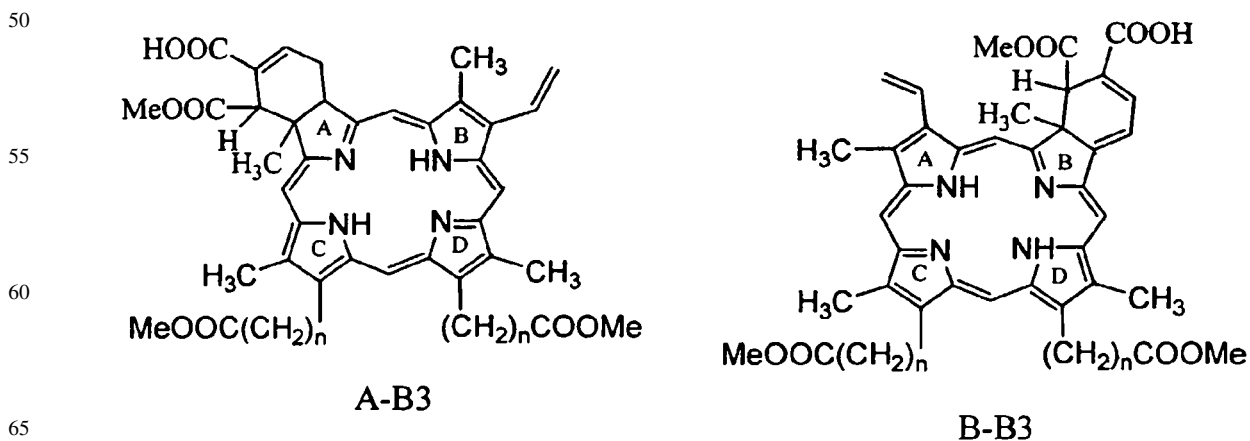
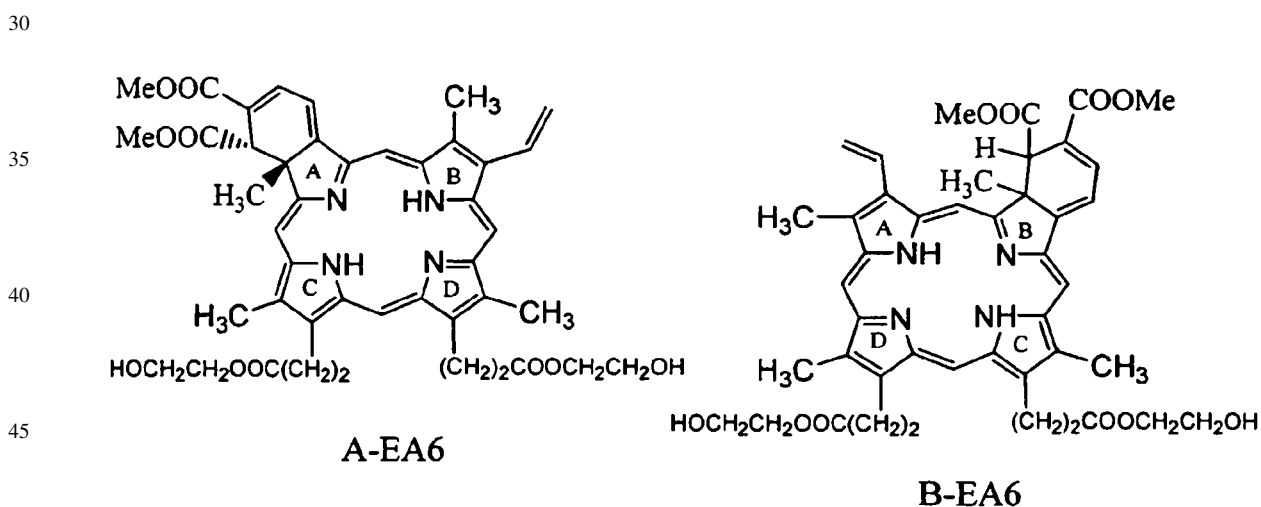
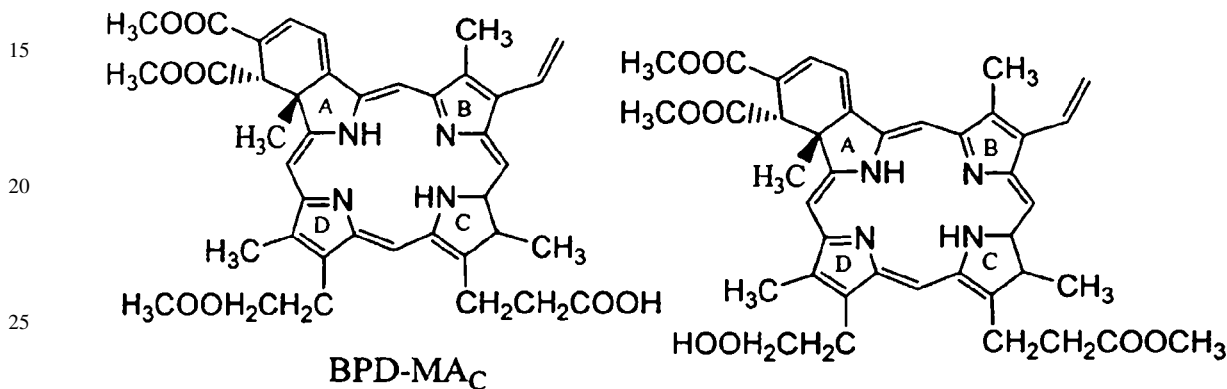


ES 2 341 646 T3

donde R^4 es vinilo ó 1-hidroxietilo y R^1 , R^2 , y R^3 son H o alquilo o alquilo sustituido, y n es un número entero entre 0 y 6, preferentemente 2.

El BPD-MA tiene la estructura mostrada en la fórmula 1 en la que R^1 y R^2 son metilo, R^4 es vinilo y uno de los R^3 es H y el otro es metilo. EA6 tiene la fórmula 2 en la que R^1 y R^2 son metilo y ambos R^3 son 2-hidroxietilo (es decir, los ésteres del etilenglicol). B3 tiene la fórmula 2 en la que R^1 es metilo, R^2 es H, y ambos R^3 son metilo. Tanto en EA6 como en B3, R^4 es también vinilo.

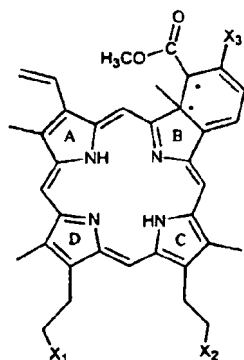
Las representaciones de BPD-MA_C y BPD-MA_D, que son los componentes de la verteoporfina, así como las ilustraciones de las formas de anillo A y B de EA6 y B3, son como sigue:



ES 2 341 646 T3

También resultan útiles los compuestos relacionados con las fórmulas 3 y 4; en general, R⁴ será vinilo o 1-hidroxietilo y R¹, R², y R³ son H ó alquilo ó alquilo sustituido.

Más adelante se muestran ejemplos adicionales de compuestos hidrófobos de BPD de anillo B que resultan difíciles de formular, y que son especialmente apropiados para utilizar en la invención, donde los asteriscos indican posiciones de carbono quiral.



Fármaco	X ₁	X ₂	X ₃
QLT0060	CO(O(CH ₂) ₂)OH	CO(O(CH ₂) ₂)OH	COOCH ₃
QLT0069	COOCH ₃	COOCH ₃	COOH
QLT0078	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OH	COOCH ₃
QLT0080	CO(O(CH ₂) ₂) ₃ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₃ OH	COOCH ₃
QLT0081	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OCH ₃	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OCH ₃	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OCH ₃
QLT0082	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OH	CO(O(CH ₂) ₂)OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₂ OH
QLT0083	CO(O(CH ₂) ₂) ₃ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₃ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₃ OH
QLT0087	CO(O(CH ₂) ₂) ₄ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₄ OH	COOCH ₃
QLT0088	COOCH ₃	COOCH ₃	CONH(C ₆ H ₄)(C ₅ H ₁₀ N)
QLT0090	CO(O(CH ₂) ₂) ₅ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₅ OH	COOCH ₃
QLT0093	CO(O(CH ₂) ₂) ₅ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₅ OH	CO(O(CH ₂) ₂) ₅ OH

Además, los fotosensibilizadores utilizados en la invención pueden conjugarse con diversos ligandos para facilitar el direccionamiento al tejido diana. Estos ligandos incluyen aquellos que son específicos de receptor así como las inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas. Los ligandos preferentes incluyen anticuerpos en general y anticuerpos monoclonales, así como fragmentos inmunológicamente reactivos de ambos.

La presente invención se aplica con particular ventaja en situaciones donde el fotosensibilizador es hidrófobo y por lo tanto no se utiliza o se administra fácilmente en el tratamiento PDT de los sujetos. Por supuesto, los fotosensibilizadores de la invención pueden formularse en nanopartículas para su administración como agente fotosensibilizador único como una mezcla de más de un agente fotosensibilizador.

Preparación de nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador

Se conocen diversos métodos para preparar nanopartículas cargadas con fármacos (véase, Allémann *et al.* (1.993) Eur. J. Pharm Biopharm 39(5), 173-191). Resultan especialmente preferentes el método de purificación salina y el método de emulsión.

La técnica de purificación salina desarrollada por Bindschaedler, descrita en Bindschaedler *et al.* (1.998) J. Pharm. Sci. 77(8):696-698, se adaptó anteriormente para la preparación de nanosferas cargadas con fármacos (véase Allémann, Tesis Doctoral, universidad de Ginebra, 1.993). La técnica implica la separación de un disolvente miscible en agua de una solución acuosa mediante una purificación salina.

ES 2 341 646 T3

Las nanopartículas de la invención pueden prepararse disolviendo primero el fármaco fotosensibilizador y el polímero en tetrahidrofurano (THF) u otro disolvente orgánico en el que los componentes sean solubles para formar una fase orgánica. Dependiendo de la solubilidad del fármaco, otros disolventes que podrían utilizarse incluyen, pero no se limitan al ácido acético, diclorometano, cloroformo, N-metilpirrolidona, acetona, éter, isopropanol, ter-butanol, etanol, metanol, bencil alcohol, acetato de etilo y carbonato de propileno. La cantidad de fotosensibilizador añadida puede variarse entre aproximadamente un 1 y un 20% (p/p) del peso total del polímero de poliéster y fotosensibilizador combinados. Si se añade más de aproximadamente un 20% en peso de fotosensibilizador, el porcentaje de fotosensibilizador incorporado en las nanopartículas disminuye, y el fármaco se desaprovecha. Preferentemente, la cantidad de fotosensibilizador añadido se encuentra entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 15% y más preferentemente aproximadamente un 10% del peso del polímero de poliéster. Resulta más preferente una cantidad de fotosensibilizador entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 10% del peso del polímero.

A continuación se añade una solución acuosa (fase acuosa) que contiene una sal soluble en agua como cloruro de magnesio (como una forma de realización preferente) o acetato de magnesio, y un polímero hidrófilo como el alcohol de polivinilo (PVAL) a la fase orgánica descrita anteriormente. El PVAL actúa como un coloide estabilizante. A continuación se emulsiona la mezcla bajo agitación mecánica enérgica, por ejemplo, mediante agitación magnética. Otras formas de agitador mecánico que podrían utilizarse son un agitador de hélice, o un agitador equipado con una paleta, o un agitador equipado con una hélice de cuatro brazos, u otro medio de agitación conocido en la técnica. Resultan preferentes los PVALs con un grado de hidrólisis superior al 70%, y preferentemente superior al 85%. PVALs adecuados se comercializan bajo la marca comercial MOWIOL® (Hoechst AG, Alemania). Otros polímeros hidrófilos que podrían utilizarse como alternativa a los PVALs son los poloxámeros, como el Poloxámero 407 (Pluronic F127) o el Poloxámero 188 (Pluronic F68). La concentración de PVAL en la fase acuosa se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5-20%, y más preferentemente aproximadamente 10-15%. La sal soluble en agua se incluye para facilitar la separación de la fase acuosa de la fase orgánica.

La invención incluye el descubrimiento de que generalmente, una agitación mecánica más enérgica favorece la producción de nanopartículas más pequeñas. Por ejemplo, a una velocidad de agitación de 400 RPM, las nanopartículas formadas tienden a ser mayores, en el intervalo de varios miles de nm de diámetro. Aumentar la velocidad de agitación a 800 RPM o más, y preferentemente hasta aproximadamente 1.800 RPM o más, tiende a disminuir el tamaño de las nanopartículas formadas. La cantidad de agitación mecánica a utilizar con cualquier dispositivo concreto puede determinarse empíricamente midiendo el tamaño de las nanopartículas producidas a una intensidad de agitación tras un período de tiempo dado, y aumentando a continuación la intensidad o la duración de la agitación hasta obtener el tamaño de partícula deseado.

Se diluye la emulsión con un volumen suficiente de agua para mejorar la difusión del THF en la fase acuosa, induciendo la formación de nanopartículas. Las nanopartículas se purifican eliminando el cloruro de magnesio y el THF residuales mediante una filtración de flujo cruzado u otros medios conocidos en la técnica.

En un protocolo típico, se disolvió un fotosensibilizador, p. ej., BPD-MA ó QLT 0069 en 4,15 g de THF. A continuación se disolvió PLA (0,85 gm menos el peso del fotosensibilizador utilizado) en el THF bajo agitación magnética para producir 5 mg de una solución viscosa. Se añadieron veinte gramos de una fase acuosa que contenía 3 gm de PVAL y 12 g de MgCl₂.6H₂O bajo agitación magnética enérgica (2.000 rpm) a temperatura ambiente (véase la Tabla 2). Tras la inversión de fase, se formó una emulsión de aceite en agua. Se agitó la emulsión durante 15 minutos para permitir una buena homogeneización. Posteriormente, se añadieron 40 gm de agua destilada para inducir la difusión completa del THF en la fase acuosa, llevando así a la formación de nanopartículas.

Tabla 2. Fórmula típica de nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador preparadas por el método de purificación salina

<u>Fase acuosa:</u>	Porcentaje en peso
MgCl ₂ .6H ₂ O	60%
PVAL (alcohol de polivinilo)	15%
Agua destilada	25%
<u>Fase orgánica:</u>	
Polímero de poliéster p. ej. PLA ó PGLA	(17-X)%
Fotosensibilizador p. ej. BPD-MA, QLT 0069	X%, donde X se encuentra entre 1/100 y 1/5 del peso del polímero de poliéster
THF	83%

Las nanopartículas también pueden producirse mediante una técnica de emulsificación-difusión, como alternativa al proceso de purificación salina. Una fase orgánica, como un PLGA y un fotosensibilizador disueltos en alcohol de bencilo (u otro disolvente orgánico en el que el fármaco sea soluble) se emulsiona con una fase acuosa, preferentemente tamponada, que contenga polímeros hidrófilos como el PVAL mediante agitación mecánica a 2.000 RPM durante 15 minutos. A continuación se añade agua o un tampón a la emulsión resultante bajo agitación para permitir la completa difusión del disolvente en el agua e inducir la formación de nanopartículas. En la Tabla 3 se muestra una fórmula típica para la preparación de nanopartículas mediante el método de emulsificación-difusión.

Tabla 3. Fórmula típica de nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador preparadas mediante el método de emulsificación-difusión	
<u>Fase acuosa:</u>	Porcentaje en peso
Agua destilada, tampón Tris maleato, pH 8,5	83%
PVAL (alcohol de polivinilo)	17%
<u>Fase orgánica:</u>	Porcentaje en peso
Polímero de poliéster p. ej. PLGA	4,10%
Fotosensibilizador p. ej. QLT 0069	0,32%
Alcohol de bencilo	95,58%

Las nanopartículas producidas mediante los métodos de purificación salina y emulsión-difusión pueden esterilizarse mediante filtración a través de un filtro de 0,22 micrones, si se desea una preparación estéril. La invención incluye los parámetros de proceso para producir nanopartículas de un tamaño lo suficientemente pequeño para facilitar una esterilización eficaz mediante filtración. Los parámetros incluyen el uso de una velocidad de agitación desde 2.000 hasta 8.000 rpm; aumentar el porcentaje de PVAL para que se encuentre por encima de un 10% p/p; y aumentar el tiempo de agitación para que sea superior a 5 minutos. De esta manera un conjunto inicial de parámetros de proceso a utilizar es una velocidad de agitación de 2.000 rpm, un 15% de PVAL, y un tiempo de agitación de 15 minutos utilizando una concentración del 17% de polímero de poliéster. Los parámetros de proceso adicionales para reducir el tamaño de las nanopartículas incluyen disminuir la cantidad de polímero de poliéster para que se encuentre por debajo del 25% (que es equivalente a disminuir la viscosidad de la fase orgánica aumentando el disolvente); la naturaleza del disolvente orgánico; la relación entre la fases acuosa y la orgánica; la elección del polímero de poliéster, la peso molecular del polímero de poliéster; y el pH de la fase acuosa.

Tras la producción, las nanopartículas pueden liofilizarse para prolongar su durabilidad, y de esta manera la durabilidad del fotosensibilizador cargado. Es preferible incluir un lioprotector antes de la liofilización para ayudar a la redispersión de las nanopartículas tras la liofilización. El lioprotector también puede ayudar a mantener un tamaño pequeño tras la liofilización. Preferentemente, se añade una cantidad de lioprotector de manera que la relación de masa lioprotector/nanopartícula se encuentre entre 0/1 y 2/1. Lioprotectores adecuados incluyen, trehalosa, lactosa, glucosa y manitol. La trehalosa es un lioprotector preferente.

Las nanopartículas cargadas con el fotosensibilizador liofilizadas pueden reconstituirse con un volumen de agua estéril que dé una concentración de fotosensibilizador en el intervalo comprendido entre 1 y 2 mg/ml antes de administrarse a un sujeto o destinarse a otro uso.

Propiedades de las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador

Las nanopartículas cargadas con el fotosensibilizador tienen preferentemente un diámetro medio inferior a 220 nm, aunque pueden ser mayores si no se desea una filtración estéril. Preferentemente, una preparación de nanopartículas tiene un diámetro medio aproximadamente inferior a 200 nm, más preferentemente entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 200 nm. El tamaño de las nanopartículas puede medirse mediante una serie de medios conocidos en la técnica para medir partículas pequeñas, que incluyen el uso de un equipo medidor de partículas Nicomp™ como se describe en el Ejemplo 4, o un equipo Coulter® Nano-Sizer (Coulter Electronics, Harpenden, Hertfordshire, RU).

Por lo general, la concentración de porfirina verde en las nanopartículas depende de la naturaleza del fotosensibilizador utilizado. Cuando se utiliza una porfirina verde, como la verteporfina o la QLT 0069, la cantidad de fotosensibilizador incorporado en la nanopartícula se encuentra preferentemente entre aproximadamente un 1% en peso y aproximadamente un 20% en peso, y más preferentemente entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 13% en peso, e incluso más preferentemente entre aproximadamente un 3 y aproximadamente un 10% en peso.

ES 2 341 646 T3

Las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador de la invención tienen la propiedad inesperada de liberar el fármaco de la nanopartícula rápidamente tras el contacto con un suero o un suero diluido. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que el fotosensibilizador se transfiere a las proteínas del suero. Preferentemente, las nanopartículas liberan por lo menos un 50% del fotosensibilizador dentro de aproximadamente los 5 minutos, y preferentemente dentro de los 5 aproximadamente de uno a tres minutos tras el contacto con el medio que contiene suero. El medio que contiene suero puede ser un medio que contiene desde un 1 hasta un 100% de seroalbúmina bovina (BSA) o suero humano o de otro animal, o puede ser la sangre u otro fluido corporal de un ser humano o de otro animal. El contacto con el medio que contiene suero se da cuando las nanopartículas cargadas con el fotosensibilizador se administran a un sujeto humano sometido a terapia fotodinámica. De manera alternativa, el contacto puede darse mediante la administración de nanopartículas a un fluido corporal, como la sangre, extraída de un animal y devuelta opcionalmente al animal como parte de un protocolo de tratamiento PDT. La velocidad de liberación del fotosensibilizador de las nanopartículas puede determinarse mediante un ensayo similar al descrito en el Ejemplo 6.

Formulaciones

Las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador se formulan convencionalmente como unos polvos liofilizados estériles que contienen trehalosa u otro lioprotector. Un polvo típico contiene preferentemente una relación lioprotector/nanopartícula en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5, preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,6 y 3,0, y más preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,8 y 2,0 en peso/peso. Un polvo liofilizado estéril que contiene nanopartículas y un lioprotector opcional puede reconstituirse en un medio acuoso para administrarse a un ser humano o a otro animal. El medio acuoso es preferentemente un medio estéril farmacéuticamente aceptable, por ejemplo dextrosa al 5% o solución salina normal. De manera alternativa, el medio puede ser agua para inyección donde la cantidad de lioprotector u otro aditivo resulte suficiente para dar el material reconstituido adecuado para su uso terapéutico o farmacéutico.

Las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador de la invención pueden formularse en una variedad de composiciones adicionales. Estas composiciones también pueden comprender unos componentes adicionales, como excipientes y vehículos de administración convencionales que incluyen agentes isotonzantes, reguladores del pH, disolventes, solubilizadores, tinciones, agentes gelificantes y espesantes y tampones y combinaciones de los mismos. Las dosificaciones y formulaciones apropiadas para la administración de fotosensibilizadores son conocidas en la técnica. Los excipientes adecuados para su uso con fotosensibilizadores incluyen agua, solución fisiológica, dextrosa, glicerol y similares.

La cantidad o concentración concreta de un fotosensibilizador dado se ajusta de acuerdo con su potencia de fotosensibilización. Por ejemplo, puede utilizarse BPD-DA pero a una concentración aproximadamente cinco veces mayor que la de BPD-MA. Los agentes isotonzantes adecuados son preferentemente agentes isotonzantes no iónicos como el glicerol, sorbitol, manitol, aminoetanol o propilenglicol así como agentes isotonzantes iónicos como el cloruro de sodio. Las soluciones de esta invención contendrán el agente isotonzante, si está presente, en una cantidad suficiente para producir la formulación de una solución aproximadamente isotónica. Se tomará la expresión “una solución aproximadamente isotónica” para referirse en este contexto a una solución con una osmolaridad de aproximadamente 300 miliosmoles (mOsm), convenientemente 300 + 10% mOsm. Debería tenerse en cuenta que todos los componentes de la solución contribuyen a la osmolaridad. El agente isotonzante no iónico, si está presente, se añade en las cantidades habituales, es decir, preferentemente en cantidades de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3,5 por ciento en peso, preferentemente en cantidades de aproximadamente 1,5 a 3 por ciento en peso. Los resúmenes de las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso con fotosensibilizadores son conocidos en la técnica y se encuentran, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Administración de y uso de nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador en una terapia fotodinámica

Las nanopartículas cargadas con un fotosensibilizador de la invención pueden administrarse sistémicamente o localmente y pueden utilizarse solas o como componentes de mezclas. La ruta de administración puede ser tópica, intravenosa, oral, subcutánea, local (p. ej., en el ojo) o mediante el uso de un implante. Por ejemplo los fotosensibilizadores cargados con porfirinas verdes pueden administrarse por medios que incluyen, las preparaciones tópicas, infusión o inyección intravenosa, ingesta oral, o administración local en forma de inyección intradérmica o un implante. Las rutas adicionales de administración son inyecciones subcutáneas, intramusculares, o intraperitoneales de formas convencionales o convenientes. Para la administración tópica, las nanopartículas cargadas con fotosensibilizador pueden encontrarse en composiciones y formulaciones tópicas estándares que incluyen lociones, suspensiones o pastas.

La dosis de los fotosensibilizadores puede ser optimizada por la persona experta dependiendo de factores como el fotosensibilizador elegido, la naturaleza del protocolo terapéutico, el propio sujeto, y el criterio del médico experto. Las cantidades preferentes de los fotosensibilizadores son aquellas que resulten clínicamente o terapéuticamente efectivas en el método de tratamiento que se esté utilizando. Tales cantidades son denominadas en la presente memoria “cantidades efectivas”.

Hay que reseñar que los diversos parámetros utilizados para la PDT efectiva en la invención están interrelacionados. Por tanto, la dosis también debería ajustarse con respecto a otros parámetros, por ejemplo, la fluencia, irradiancia, duración de la luz utilizada en el PDT, y el intervalo de tiempo entre la administración de la dosis y la radiación

ES 2 341 646 T3

terapéutica. Con los fotosensibilizadores, por ejemplo, la forma de administración, como cuando se ha acoplado a un ligando específico de diana, como un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, es un factor considerado por un experto.

5 Dependiendo de las necesidades del sujeto y de las restricciones del método de tratamiento que se esté utilizando, pueden necesitarse dosis de fotosensibilizador menores o mayores. Para composiciones que sean altamente específicas de las células y tejidos cutáneos diana, como aquellas con el fotosensibilizador conjugado con una preparación de anticuerpos monoclonales altamente específicos o un ligando específico para el receptor, se sugieren dosificaciones en el intervalo comprendido entre 0,005-10 mg/kg de peso corporal. Para composiciones, que sean menos específicas para la diana, pueden resultar deseables dosificaciones mayores, de hasta 1-10 mg/kg. El intervalo preferente para su uso en ratones está comprendido entre los 0,05 mg/kg y los 10 mg/kg. El intervalo útil en seres humanos para el fotosensibilizador será generalmente menor que el de los ratones, como desde 0,005 mg/kg hasta 2 mg/kg. Los intervalos anteriores son una mera sugerencia en lo referente a que el número de variables con respecto a un régimen de tratamiento individual es grande y pueden esperarse desviaciones considerables de estos valores. El experto es libre de variar las concentraciones anteriores de manera que los parámetros de estimulación/restauración y absorción estén en conformidad con los objetivos terapéuticos descritos anteriormente.

Además de los sujetos humanos, la presente invención puede aplicarse a animales no humanos, como los mamíferos, especialmente aquellos importantes en aplicaciones agrícolas (como ganado, ovejas, caballos y otros “animales de granja”, pero sin limitarse a ellos), aplicaciones industriales (como los animales utilizados para generar moléculas bioactivas como parte de las industrias farmacéutica y biotecnológica), y a los animales de compañía (como perros y gatos).

25 Cada fotosensibilizador requiere activarse con una radiación de longitud de onda apropiada. Como tal, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo con cualquier radiación, preferentemente en el intervalo de la luz visible, que activa el fotosensibilizador utilizado. Preferentemente, la radiación contiene una o más longitudes de onda capaces de penetrar la piel para activar el fotosensibilizador utilizado. La(s) longitud(es) de onda de la radiación o luz útil en la invención depende del intervalo de activación del fotosensibilizador utilizado como parte del método de tratamiento. Resultan preferentes longitudes de onda de aproximadamente 380-900 nanómetros (nm), dependiendo del fotosensibilizador y de la profundidad de penetración en el tejido deseada. Resultan más preferentes longitudes de onda desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 900 nm, más preferentes desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 700 nm. Por ejemplo, el BPD-MA, un derivado de la porfirina verde, puede activarse mediante la luz roja y la azul así como luz ambiental que contenga longitudes de onda desde 400-900 nm. La luz con una longitud de onda más corta que 400 nm resulta aceptable, pero no preferente debido a los efectos potencialmente dañinos de la luz UVA.

35 Puede utilizarse una fuente de luz apropiada, preferentemente un láser o diodo láser, en el intervalo comprendido entre aproximadamente 550 y aproximadamente 900 nm, dependiendo del espectro de absorción del fotosensibilizador, para la activación del fotosensibilizador. Una longitud de onda apropiada y preferente para un láser de este tipo incluye $690 \pm 12,5$ nm a media altura cuando se utilizan porfirinas verdes BPDs. La dosis de luz administrada durante el tratamiento PDT contemplada en la presente memoria puede variar, y puede estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 J/cm². La dosis de luz se elige dependiendo de la potencia del fotosensibilizador, la dosificación del fotosensibilizador y la finalidad del tratamiento fotodinámico. Cuando se está llevando a cabo el PDT para extirpar un tejido canceroso, entonces resultan generalmente deseables dosis de radiación más altas, en el intervalo comprendido entre 100-250 J/cm² y algunas veces incluso mayores. Cuando el PDT se lleva a cabo para modular una respuesta inmune, más que matar el tejido diana, es preferible que la radiación se dé a una dosis menor para reducir los efectos colaterales no deseados a la vez que se sigue activando el fotosensibilizador. La dosis de radiación utilizada (denominada “PDT a dosis baja”) es preferentemente de una intensidad menor que la utilizada para el tratamiento oncogénico. Un intervalo preferente se encuentra comprendido entre 0,1 y 20 J/cm².

50 Cuando el PDT se lleva a cabo para tratar una neovascularización (coroidea) en el ojo (como la asociada a la AMD), se utilizan generalmente dosis de luz intermedias, en el intervalo comprendido entre 20 y 100 J/cm². Por ejemplo, la dosificación de luz recomendada por Visudyne[®] utilizada en el tratamiento de la AMD es de 50 J/cm². Los aumentos de la radiación pueden disminuir los tiempos de exposición. Generalmente, una dosis mayor de fotosensibilizador disminuirá la dosis de luz requerida para ejercer un efecto terapéutico.

55 El tiempo de la radiación de luz tras la administración del fotosensibilizador puede resultar importante como una manera de maximizar la selectividad del tratamiento, y minimizar así el daño a estructuras diferentes de las células tumorales diana. En general debería utilizarse el tratamiento de luz dentro de las tres horas, y más preferentemente dentro de una hora tras la administración del fotosensibilizador.

60 Se dan los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

65 *Preparación de nanopartículas poliméricas cargadas con benzoporfirina*

Materiales: Las nanopartículas mostradas en los ejemplos más adelante se produjeron utilizando tres tipos de poliésteres todos ellos con diversos pesos moleculares obtenidos de Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania):

ES 2 341 646 T3

- i) 50:50 PLGA (RG502 y RG502H (pesos moleculares (Pm) = 12.000) y RG504H (Pm=48.000));
- ii) 75:25 PLGA (RG752 (Pm=12.000), RG755 (Pm=63.000), y RG756 (Pm=98.000)) y
- 5 iii) PLA puro (R104 (Pm=2.000), R202 y R202H (Pm=16.000) y R203 (Pm=28.000)).

También pueden utilizarse poliésteres adicionales, mostrados en la Tabla 1.

Se seleccionaron alcohol de (poli)vinilo (PVAL) hidrolizado al 87,7% con un Pm de 26.000 (Mowiol® 4-88) e hidrolizado al 82,6% con un Pm de 18.000 (Mowiol® 3-83) (Hoechst, Frankfurt/Main, Alemania) como coloide estabilizante. Se utilizó cloruro de magnesio hexahidrato (MgCl₂.6H₂O) (Fluka Biochemika, Buchs, Suiza) como agente de purificación salina. Se utilizaron tetrahidrofurano (THF) (Merck, Darmstadt, Alemania) y acetona (Fluka Biochemika, Buchs, Suiza) como disolventes orgánicos miscibles en agua. Estos disolventes se eligieron en base a un trabajo anterior (Ibrahim *et al.*, 1.992; Allémann *et al.*, 1.992) y las propiedades farmacéuticas con respecto a la toxicidad (Witschi *et al.*, 1.997). Se utilizaron D(+)-trehalosa dihidrato (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), lactosa monohidrato (Hänseler AG, Herisau, Suiza), D(-)-manitol (Riedel-de Haën®, Seelze, Alemania) y D(+)-glucosa anhidra (Fluka Biochemika, Buchs, Suiza) como lioprotectores. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y se utilizaron como tales sin una purificación adicional.

Métodos: Se investigó la posibilidad de producir nanopartículas muy pequeñas utilizando el proceso de purificación salina. Primero se eligieron los parámetros de acuerdo con un trabajo anterior (Ibrahim *et al.*, 1.992; Allémann *et al.*, 1.992; Allémann *et al.*, 1.993a) y a continuación se variaron para investigar la influencia en el tamaño medio de las partículas. Por lo general, se añadieron 5 g de una solución orgánica que contenía cantidades variables de PLGA o PLA y un fotosensibilizador bajo agitación mecánica a 20 g de una fase acuosa que contenía PVAL, un agente de purificación salina al 60% (p/p) (MgCl₂.6H₂O). Tras la formación de una emulsión de aceite en agua a temperatura ambiente, se añadieron 60 ml de agua pura para inducir la difusión completa del disolvente en la fase acuosa, llevando así a la formación de nanopartículas. Puesto que la efectividad del proceso de filtración estéril resulta también influenciado por la carga microbiana de la suspensión de nanopartículas a filtrar, se utilizó rutinariamente agua filtrada a través de un filtro de membrana de 0,1 µm (Millipore®, MilliQ Academic, Suiza) para la preparación y la purificación de las nanopartículas.

Para obtener las condiciones para la preparación de nanopartículas por debajo de 200 nm, primero se llevaron a cabo investigaciones preliminares utilizando una solución de THF que contenía un 17% (p/p) de RG755 como fase orgánica. Se evaluó el tamaño de las partículas como función de: a) la velocidad de agitación (2.000-13.500 rpm); b) el tiempo de agitación de la emulsificación (5-50 min); c) el peso molecular del PVAL (18.000-26.000 Da); y el porcentaje de PVAL (10-15% (p/p)). También se varió el porcentaje de polímero (10-17% (p/p)).

La purificación de las dispersiones de nanopartículas se realizó mediante filtración de flujo cruzado. Se purificaron las dispersiones de nanopartículas crudas mediante filtración de flujo cruzado utilizando un mini dispositivo Sartocor® equipado con una membrana de ultrafiltración con un "cut off" de la membrana de 300.000 Da (Sartorius, Goettingen, Alemania) para eliminar los aditivos solubles (THF, MgCl₂ y PVAL). Se llevó a cabo la filtración añadiendo volúmenes de agua que se recogieron como fracciones de filtración. La cantidad de PVAL eliminado en cada fracción de filtración se determinó mediante un método colorimétrico.

Ejemplo 2

Identificación de las condiciones que favorecen la producción de nanopartículas pequeñas

Los intentos iniciales de incorporar fotosensibilizadores en las nanopartículas de poliéster proporcionaron nanopartículas demasiado grandes para la filtración estéril, en el intervalo comprendido entre 300 y 500 nm, o incluso mayores si se utilizaban velocidades de agitación en el intervalo comprendido entre 400-800 rpm para homogeneizar las fases orgánica y acuosa durante la formación de las nanopartículas. Se llevaron a cabo diversos experimentos en un intento de identificar las condiciones que producían nanopartículas con un diámetro medio inferior a 200 nm. Se variaron los siguientes parámetros para la preparación de las nanopartículas utilizando el proceso de purificación salina como se indica más adelante, para obtener nanopartículas por debajo de 200 nm.

Fase acuosa

Alcohol de (poli)vinilo (PVAL)	10% (p/p)
MgCl ₂ .6H ₂ O	60% (p/p)
Agua destilada	30% (p/p)

ES 2 341 646 T3

Fase orgánica

5	Polímeros de poliéster	17% (p/p)
	Tetrahidrofurano (THF)	83% (p/p)
	Fotosensibilizador	variable

10

Se utilizaron los siguientes parámetros para el procedimiento de emulsión.

15	Relación fase acuosa/orgánica	1,5/1
	Velocidad de agitación	1.800 rpm
	Tiempo de emulsificación	15 min

20

Los parámetros de proceso que disminuían el tamaño medio de las partículas de 300 nm a nanopartículas por debajo de 200 nm son:

25 Velocidad de agitación: Un aumento de la velocidad de agitación de 2.000 a 8.000 rpm llevó a una disminución del tamaño de las nanopartículas R202 de 270 nm a 150 nm.

30 Porcentaje de PVAL: A una velocidad de agitación de 2.000 rpm, cuando se aumentó el porcentaje de PVAL progresivamente de un 10 a un 15% (p/p), el tamaño medio de las nanopartículas se redujo de 275 a 148 nm.

Tiempo de agitación: aumentar el tiempo de agitación durante la emulsificación de 5 a 15 min resultó en la reducción del tamaño de las nanopartículas RG755 de 198 a 148 nm.

35 Con los siguientes parámetros de velocidad de agitación 2.000 rpm, duración de la emulsificación 15 min, concentración de PVAL 15% y concentración del polímero 17% como punto de inicio, los parámetros de proceso adicionales que influían en el tamaño de las partículas se identificaron como:

40 Porcentaje del polímero: Disminuir el porcentaje de polímero en la fase orgánica (o disminuir la viscosidad de la fase orgánica) de un 25% a un 10% (p/p) llevó a una disminución del 50% del tamaño medio de las partículas (de 300 a 150 nm).

45 Naturaleza del disolvente orgánico: se obtuvieron nanopartículas RG504H con un tamaño medio de 210 nm cuando se utilizó acetona como disolvente, mientras que pudo conseguirse un tamaño medio de 154 nm con THF.

Relación fase acuosa/orgánica: Un aumento de la relación entre la fase acuosa/orgánica de 1,5/1 a 4/1 posibilitó la producción de nanopartículas por debajo de 200 nm.

50 Propiedades del polímero (composición, peso molecular): pudieron producirse nanopartículas RG504H por debajo de 200 nm con un tamaño medio de 154 nm, mientras que utilizando los mismos parámetros de proceso, se obtuvieron partículas mayores con el polímero RG504. Con respecto a los polímeros de caprolactona, el tamaño medio de las partículas aumenta de 143 a 290 nm al aumentar el peso molecular del polímero de 13.000 a 80.000 Da.

55 Naturaleza de la fase acuosa (influencia del pH de la fase acuosa): El pH de la fase acuosa (p. ej., utilizando tampón tris maleato (pH 8,5) como fase externa, resultó posible la preparación de nanopartículas cargadas con QLT 0069 con un tamaño de partícula de 120 nm mientras que con agua destilada pura como fase externa, el tamaño final fue de por lo menos 500 nm.

60 Ejemplo 3

Preparación de nanopartículas cargadas con verteporfina por debajo de 200 nm

65 Se prepararon nanopartículas que contenían verteporfina de acuerdo con el protocolo que se presenta a continuación, y se analizó su tamaño y contenido de fármaco.

ES 2 341 646 T3

<u>Componente</u>	<u>% de la fase en peso</u>	<u>gramos</u>
<u>Fase acuosa</u>		
MgCl ₂ .6H ₂ O	60	12,0
PVAL (Mowiol® 3-83)	15	3,0
H ₂ O destilada	25	5,0
Peso total de la fase acuosa		20
<u>Fase orgánica</u>		
PLA	15,3	0,8303
Verteoporfina	1,7	0,0919
THF	83,0	3,6810
<u>Procedimiento de emulsificación</u>		
Fase acuosa	20,0 g	
Fase orgánica	5,43 g	
Velocidad de agitación	2.000 rpm	
Tiempo de agitación	15 minutos	
Tiempo del proceso completo	20 minutos	
<u>Liofilización</u>		
Ciclo de 4 días		
Relación trehalosa/nanopartícula: 0,84 (p/p)		
<u>Características de las nanopartículas</u>		
Tamaño medio tras la liofilización: 139 +/- 3 nm		
Carga de fármaco: 7,0+/-0,7%		
Eficacia de atrapamiento: 70.2+/-6,7%		

Ejemplo 4

55 *Tamaño de las partículas, retención del fármaco y esterilización de las nanopartículas cargadas con verteoporfina*

Se determinó la retención del fármaco haciendo pasar las formulaciones a través de filtros Millex GV de 0,22 micrones y se midió la concentración de benzoporfirina mediante espectrofotometría antes y después de la filtración. A continuación se almacenaron las formulaciones durante un período seleccionado a 2-8°C y se analizó la concentración de benzoporfirina antes y después de la filtración de 0,22 micrones.

Se midió el tamaño de las partículas utilizando la espectrometría de correlación de fotones utilizando un equipo Coulter® Nano-Sizer™ (Coulter Electronics Harpenden, Hertfordshire, RU), o un medidor de partículas Nicomp 380. El índice de polidispersión (PI) es un indicio de la distribución de tamaño con valores que van de 0 a 9. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se confirmó la precisión del espectrómetro de correlación de fotones utilizando partículas estándares de látex uniformes de poliestireno (204 ± 6 nm) (Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA, EEUU). Cada valor es la media de tres mediciones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

ES 2 341 646 T3

TABLA 4

Influencia de la naturaleza del disolvente en el tamaño medio de las partículas crudas y la viscosidad de la fase orgánica (Fase acuosa: PVAL 15% (p/p), fase orgánica PLGA ó PLA 17% (p/p), velocidad de agitación 2.000 rpm, tiempo de agitación de la emulsificación 15 min)

5

	Polímero	Relación PLA/ PGLA	Pm	THF			Acetona		
				Viscosidad (mPa.s) ^a	Tamaño medio (nm) ^b	Plc	Viscosidad (mPa.s) ^a	Tamaño medio (nm) ^b	Plc
10									
15	RG502H	50/50	12.000	3,6±0,3	102±4	4	2,5±0,4	137±13	3
	RG502	50/50	12.000	9,7±0,1	125±9	4	2,7±0,3	173±15	2
	RG504H	50/50	48.000	47,7±3,4	154±17	4	17,6±0,5	210±66	2
20	RG752	75/25	12.000	5,5±0,3	132±3	4	3,2±0,5	120±7	3
	RG755	75/25	63.000	49,9±3,1	148±5	2	20,2±1,1	121±10	4
	RG756	75/25	98.000	157,1±6,3	152±25	4	44,2±2,5	145±5	3
25	R104	100/0	2.000	2,4±0,3	152±9	3	2,2±0,3	143±5	3
	R202	100/0	16.000	2,7±0,3	138±8	4	2,4±0,2	183±7	3
30	R202H	100/0	16.000	4,4±0,3	166±5	3	2,3±0,3	174±14	3
	R203	100/0	28.000	7,3±0,2	145±4	4	3,9±0,3	184±5	2
35	^a Media ± SD (n = 22) ^b Media ± SD (n = 3) ^c Pl: índice de polidispersabilidad, 0-9								

40

Para evaluar la redispersabilidad, se resuspendieron 2 mg de nanopartículas liofilizadas en 1 ml de agua destilada bajo agitación manual durante 30 s y se midió el tamaño de las partículas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

45

TABLA 5

Análisis de Formulaciones de Nanopartículas con Verteporfina Reconstituídas que Contenían Polímeros de PLGA, indicando el contenido de verteporfina de las nanopartículas (mg/ml)

50

(No filtrado / Filtrado)

(No filtrado/filtrado)

Lote RG755A

Lote RG755B

Día 0

1,92/1,83 mg/ml

1,32/1,31 mg/ml

Almacenados o/n @ 2-8°C

1,84/1,91 mg/ml

1,32/1,29 mg/ml

60

Análisis del Tamaño de las Partículas

Diámetro Medio (nm)

Día 0

114 nm

112 nm

Almacenados o/n @ 2-8°C

112 nm

110 nm

65

ES 2 341 646 T3

Primero se llevó a cabo el estudio de viabilidad de filtración estéril con una evaluación cualitativa de sistemas de filtros de membrana diferentes. Se sometieron a ensayo tres sistemas, Millex[®]-FG50 (membrana hidrófoba de politetrafluoroetileno), Swinnex[®]47 (membrana Durapore hidrófila (GVWP04700)), Steriflip[®] (membrana de polietersulfona Express) (Millipore[®], Volketswil, Suiza). Para evitar la posible obstrucción del dispositivo de filtración, primero se prefiltró la suspensión de nanopartículas que contenían un lioprotector a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm antes del proceso de filtración de esterilización. A continuación, se filtró la muestra prefiltrada a través de la unidad de filtros de esterilización apropiada. Después, se vertieron 40 ml de suspensión estéril en viales de vidrio estériles de 100 ml pesados previamente bajo una campana de flujo de aire laminar. Para preservar las partículas de la contaminación durante el proceso de liofilización, se cubrieron los viales con unos filtros de membrana estériles de 0.22 μm (Durapore hidrófobo, tipo GVHP, Millipore[®], Volketswil, Suiza). Se congelaron las suspensiones estériles y se liofilizaron como se describe más adelante.

Para determinar si la membrana había retenido cantidades significativas de nanopartículas, se liofilizaron alícuotas de las dispersiones de nanopartículas tomadas antes y después de la filtración. También se examinó la distribución de tamaño de las partículas antes y después de la filtración.

Se llevó a cabo el ensayo de esterilidad en las nanopartículas liofilizadas, siguiendo las directrices de la Farmacopea Europea (adenda 1.999). Se eligió como método de ensayo la filtración por membrana seguida de la incubación de la membrana en un medio de cultivo. Por lo general, se hicieron pasar 50 mg de nanopartículas secas dispersadas en 100 ml de agua estéril a través de un filtro de membrana de 0,22 micrones (47 mm de diámetro). A continuación, se retiró asépticamente la membrana del soporte. Después de lavarla con tres partes de solución de peptona estéril, cada mitad de la membrana se sumergió en unos tubos que contenían un medio apropiado. Se utilizó como medio aerobio o anaerobio caldo tioglicolato con resazurina (BioMerieux[®], Marcy, Francia) para la detección de bacterias (excepto *Bacillus subtilis*, que crece en caldo tripticasa-soja) y se utilizó caldo tripticasa-soja como medio para la detección de levaduras y hongos. Se utilizaron membranas no estériles como controles positivos. Se incubaron los tubos durante 14 días a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ (medio tioglicolato con resazurina) ó a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ (medio tripticasa). A continuación se observó la turbidez de los medios durante un período básico de 14 días en comparación a los controles positivos. El experimento se realizó dos veces.

Se llevó a cabo el ensayo de esterilidad utilizando las mismas condiciones tal como se ha descrito anteriormente. Se eligieron varias categorías de microorganismos para este ensayo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) como bacterias aerobias, *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437) como bacteria anaerobia y *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Aspergillus niger* (ATCC 16404) como levaduras y hongos, respectivamente. Se prepararon cultivos diluidos de cada bacteria y hongo a partir de las cepas para obtener una concentración final de microorganismos inferior a 100 ufc/ml. Tras la filtración de las suspensiones de nanopartículas en las mismas condiciones utilizadas para el ensayo de esterilidad, se inoculó el lavado final con 1 ml de solución con microorganismos. Se incubaron las muestras como se ha descrito anteriormente durante 7 días.

Ninguno de los lotes de nanopartículas sometidos a ensayo mostró un crecimiento visible de microorganismos, contrariamente a los controles positivos para los que se observó sistemáticamente un aumento sustancial de la turbidez (datos no mostrados). Estas observaciones sugerían que se habían obtenido formulaciones finales de nanopartículas estériles.

Ejemplo 5

Caracterización de nanopartículas cargadas con verteporfina liofilizadas estériles

Se prepararon diversos lotes de nanopartículas cargadas con verteporfina con un contenido inicial de verteporfina del 10%. Se liofilizaron las suspensiones de nanopartículas en presencia de trehalosa tras la filtración estéril. Para comprobar la reproductibilidad del procedimiento, se prepararon los lotes por duplicado bajo las mismas condiciones. Para evaluar el efecto de cantidades diferentes de trehalosa en el tamaño de las nanopartículas cargadas con verteporfina, se dividió cada lote en dos alícuotas. Independientemente de la relación trehalosa/nanopartícula, se obtuvo la completa redispersión tras el liofilización, y el tamaño de las partículas se mantuvo por debajo de los 200 nm. La carga de fármaco fue del 6,7 al 8,8% (p/p) con polímeros diferentes, con una eficacia de atrapamiento que llegaba al 91% con las nanopartículas PLA. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

ES 2 341 646 T3

TABLA 6

Caracterización de las nanopartículas cargadas con verteporfina tras la liofilización y la reconstitución

Lote #	Relación PLA/PGL A	Contenido Inicial De fármaco (%)	Carga De fármaco	Eficacia De Atrapamiento (%)	Relación Trehalosa/ Nanopartícula (p/p)	Tamaño medio tras la Liofilización
RG755B	75/25	placebo	NA	NA	2,1	139 +/-2
RG755C a	75/25	10,0	6,7+/-0,8	67,14+/-7,6	1,11	132+/-2
RG755C a	75/25	10,0	7,0+/-0,7	70,18+/-6,7	0,68	134+/-6
RG755C b	75/25	10,00	7,0+/-80,67	70,18+/-6,7	0,84	139+/-3
R202B	100	placebo	NA	NA	1,06	140+/-2
R202Ca	100	10,0	8,8+/-0,4	91,0+/-4,2	0,86	157+/-3
R202Cb	100	10,0	8,8+/-0,4	91,0+/-4,2	1,82	125+/-1 1
R202Ca	100	10,0	8,6+/-0,2	86,0+/-1,9	0,91	123+/-2
R202Cb	100	10,0	8,6+/-0,2	86,0+/-1,9	1,51	127+/-3

Se determinó la concentración de verteporfina disolviendo una cantidad pesada con precisión de nanopartículas en 5 ml de THF. Su agitó la solución durante 1 h a temperatura ambiente, y se determinó la concentración de verteporfina espectrofotométricamente a 691 nm. Se utilizaron soluciones de verteporfina de concentración conocida para generar una curva de calibración. La carga de fármaco se define como:

$$\text{Carga de fármaco (\%)} = (\text{cantidad de fármaco en las nanopartículas} / \text{cantidad de nanopartículas}) \times 100.$$

La eficacia de atrapamiento del fármaco representa la proporción de la cantidad inicial de fármaco, que se ha incorporado a las nanopartículas. Se define como:

$$\text{Eficacia de atrapamiento (\%)} = (\text{porcentaje de carga de fármaco} / \text{porcentaje de contenido inicial de fármaco}) \times 100.$$

Ejemplo 6

Liberación de benzoporfirina de las nanopartículas poliméricas

Este ejemplo demuestra que las nanopartículas cargadas con verteporfina (BPD-MA) se libera de las nanopartículas a los segundos de entrar en contacto con las proteínas del suero. El ensayo se basa en la extinción de la fluorescencia de la verteporfina causada por la gran compresión en la formulación de las nanopartículas. La adición de suero resulta en una transferencia de la verteporfina desde la formulación de nanopartículas a las proteínas del plasma, acompañada de un aumento de la fluorescencia. La velocidad de transferencia es de significación biológica porque el fármaco retenido por la formulación no se encuentra fácilmente disponible para las células diana y los tejidos y es menos probable que resulte fotodinámicamente activo dentro de la formulación.

Pudo alcanzarse un aumento adicional de la fluorescencia de la verteporfina en este sistema de ensayo añadiendo Triton X-100, lo que resultó en una monomerización adicional de la verteporfina, y su disociación de los sitios de unión. Con la adición de Triton, la fluorescencia de la verteporfina en la mezcla experimental resulta máxima y puede utilizarse como punto de referencia para la determinación de la magnitud de la transferencia de verteporfina desde la formulación a las proteínas del plasma.

Se preparó una muestra de 100 μM (concentración de verteporfina) diluyendo la muestra madre de nanopartículas de verteporfina con una solución de dextrosa al 5% (5DW). Se excitó la fluorescencia con 440 nm y se recogió a 694 nm. Se mantuvieron las muestras a 37°C. Se liberaron los obturadores de emisión y excitación y se inició la traza de base temporal ($T = 0$ s). Después de 60 s, se inyectaron 0,2 mL de suero fetal bovino (FSB) con una jeringa de vidrio Hamilton a través de un septo en la cubierta de la tapa del espectrómetro. Después de 180 s adicionales, se inyectaron 0,02

ES 2 341 646 T3

mL de Triton X-100 al 10% v/v (en 5DW) en la cubeta. Las concentraciones finales de FBS y Triton X-100 fueron aproximadamente 5% v/v y 0,05% v/v, respectivamente. Se recogieron las lecturas de fluorescencia durante otros 180 s.

5 Durante los primeros 60 s de cada ensayo, se redujo la fluorescencia de la verteporfina dentro de la formulación de nanopartículas, debido a una auto extinción de la formulación fotosensibilizadora. Tras la inyección del FSB, se elevó la fluorescencia y alcanzó una meseta. El tiempo requerido para alcanzar la meseta, y la magnitud de la fluorescencia observada en la meseta en comparación con la fluorescencia del fármaco en la solución de Triton, da un indicio de la velocidad y eficacia de la transferencia del fármaco a las proteínas del suero. La verteporfina formulada en las nanopartículas mostró una transferencia rápida (Figura 2). Se obtuvo un valor medio de esta señal de fluorescencia equilibrada, marcada FFBS, promediando los valores de fluorescencia de $t = 150$ a 220 s. Tras la inyección de Triton X-100, la señal de fluorescencia se elevó más y finalmente alcanzó una meseta. Se obtuvo un valor medio de esta nueva señal de fluorescencia equilibrada, marcada FTX, promediando los valores de fluorescencia de $t = 300$ a 420 s. La relación FFBS/FTX dio un indicio de la eficacia con la que la verteporfina era transferida a las proteínas del suero desde la formulación lipídica. El valor medio de FFBS/FTX (promedio de $n = 2$ pruebas) fue 0,76 (Figura 2). Estos valores 15 sugerirían que la mayoría de la verteporfina era transferida rápidamente a las proteínas del suero dentro de los 150 seg.

Ejemplo 7

Fluorescencia cutánea de la benzoporfirina de las nanopartículas poliméricas

20 Se diluyeron formulaciones de fármacos con dextrosa al 5% a $174 \mu\text{M}$ (verteporfina) y se inyectaron intravenosamente en ratones hembra SKH1 a $1,4 \mu\text{M}/\text{kg}$ (activo). Tras las inyecciones, a continuación se mantuvo a los ratones en la oscuridad o con iluminación suave.

25 Se monitorizó la absorción mediante fluorescencia cutánea utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia de tejidos no invasiva de Princeton Instruments equipado con una sonda de fluorescencia de 5 mm de diámetro conectada a un dispositivo detector de carga acoplada enfriado con nitrógeno líquido (LN/CCD) con espectrógrafo. Se llevó a cabo la excitación con un Iluminador de Fibra Óptica Oriel equipado con un filtro pasa banda de 440 nm durante 5 seg. Se recogió la fluorescencia de la piel del ratón sobre su músculo femoral de la pierna derecha. Se normalizaron las señales de fluorescencia a señales a 650 nm donde se esperaba que la fluorescencia del fármaco fuese mínima. 30

Los resultados se muestran en la Figura 3. La fluorescencia de la verteporfina aumentó inmediatamente tras la IV administración y a continuación disminuyó rápidamente durante las siguientes 24 hrs. La eliminación rápida de la piel resulta deseable en un ámbito clínico.

35 Ejemplo 8

Actividad antitumoral de las nanopartículas cargadas con verteporfina

40 Se diluyeron formulaciones de nanopartículas cargadas con el fotosensibilizador con dextrosa al 5% a $174 \mu\text{M}$ (verteporfina) y se inyectaron intravenosamente en ratones macho DBA/2 con tumor M1 a una dosis de $1,4 \mu\text{mol}/\text{kg}$. A continuación se expuso el sitio del tumor a una luz de 690 nm a $50 \text{ J}/\text{cm}^2$ durante 9 min y 20 s a los 15, 30 ó 60 min postinyección. Se monitorizó a los ratones durante 20 días en busca de indicios de una curación o control del tumor.

45 En el estudio se utilizaron un láser de ión argón de Spectra Physics serie 2.000 y un láser de colorante Coherent modelo 599. La longitud de onda de salida del láser se puso a $690 \pm 3 \text{ nm}$ (FWHM $< 1 \text{ nm}$). Se situó la lente de fibra óptica con micro lente para iluminar un área de 1 cm de diámetro y se puso la potencia de salida de la fibra óptica a $70 \pm 6 \text{ mW}$ ($90 \text{ mW}/\text{cm}^2$ en la zona diana). El tiempo de exposición fue de 9 min 20 s, lo que envió una dosis de luz de $50 \text{ J}/\text{cm}^2$. Se evaluó la actividad antitumoral de la verteporfina formulada en una formulación de nanopartículas PLGA (YK000814RG755A) en ratones DBA/2 utilizando un modelo tumoral M1. La Tabla 7 muestra los resultados del bioensayo de tumor de los ratones macho DBA/2 a los que se había administrado intravenosamente $1,4 \mu\text{mol}/\text{kg}$ activo y expuesto a 690 nm de luz a $50 \text{ J}/\text{cm}^2$ durante 9 min y 20 s. Los tiempos de radiación temprana a los 15 y 30 min habían mejorado el control del tumor en comparación con la radiación a los 60 min. 50

TABLA 7

Resultados del Bioensayo de Tumor - Número de Animales libres de Tumor

			# de Ratones libres de Tumor			
Tratamiento	Retardo	Día 3	Día 7	Día 14	Día 20	
Nanopartículas de verteporfina	15 min	3/3	3/3	2/3	2/3	
	30 min	3/4	3/4	3/4	3/4	
	60 min	3/3	3/3	1/3	1/3	

ES 2 341 646 T3

Ejemplo 9

Fotosensibilidad cutánea tras la administración de nanopartículas cargadas con verteporfina

5 Se inyectaron a ratones hembra SKH1 intravenosamente (IV) 1,4 $\mu\text{mol/kg}$ de nanopartículas cargadas con verteporfina (lote YK000814RG755A). A continuación se inmovilizó a los animales con una inyección intraperitoneal de Ketamina (50 - 100 mg/kg)/Valium (5 mg/kg) y se colocaron inmediatamente en una cama en suspensión, cubierta con papel de aluminio y exponiendo un círculo de 1 cm sobre el flanco derecho o izquierdo.

10 En los instantes de tiempo postinyección de 15 y 60 min, se expuso el área circular de 1 cm en el flanco a un simulador solar (dosis de luz 60 J/cm²) durante 10 min por flanco. Se puntuó la superficie expuesta utilizando los parámetros descritos en la Tabla 8, en los días 1 y 3 tras la exposición de luz. Las puntuaciones se basaron en la formación de eritema, escaras y edemas. Después de la puntuación del día 3, se sometió a los ratones a eutanasia.

15 TABLA 8

Tabla de Puntuaciones de Fotosensibilidad Cutánea

La Puntuación Total de la Fotosensibilidad Cutánea es la Suma de las Puntuaciones de las observaciones de Eritema, Escaras y Edemas

Descripción de la Formación de Eritemas y Escaras

25	0	Ninguna reacción observable
	1	Apenas detectable
	2	Leve - Rosa pálido visible, sin vasos rotos, sin puntos rojos
30	3	Blanqueo – algunos vasos rotos, sin formación de escaras
	4	Eritema – más vasos rotos, llevando a la formación de escaras amarillas
35	5	Severo – muchos vasos rotos, formación de escaras – pero inferior al 50% del sitio
40	6	Muy severo – roseta, formación de escaras en más del 50% del sitio

Edemas

45	1	Ligero en el sitio de exposición
	2	Leve en el sitio de exposición (pliegue de la piel inferior a 1 mm)
50	3	Moderado – (medición del pliegue de la piel de 1 – 2 mm de grosor)
55	4	Severo – se extiende más allá del sitio de exposición (medición del pliegue de la piel > 2 mm de grosor)

(puntuación mínima = 0, puntuación máxima = 10)

60 Los ratones hembra SKH-1 mostraron niveles bajos de fotosensibilidad cutánea tras ser inyectados intravenosamente con 1,4 $\mu\text{mol/kg}$ de nanopartículas con verteporfina YK00814RG755A y expuestos a la luz de un simulador solar durante 10 min. La fotosensibilidad cutánea que surgía de la exposición al simulador solar fue mayor en los instantes de tiempo tempranos sometidos a ensayo (15 min) y disminuyó con el tiempo tras la inyección (Figura 4).
65 Los signos de eritemas, escaras y edemas habían disminuido para el día 3 lo que confirmaba la eliminación rápida de la verteporfina administrada en las nanopartículas. La eliminación rápida del fotosensibilizador resulta deseable en el ámbito clínico.

Referencias

- 5 **Allémann, E., Doelker, E., Gurny, R., 1.993a.** Drug loaded poly(lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 39, 13-18.
- Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E., 1.992.** Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible saltingout process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.*, 87, 247-253.
- 10 **Allémann, E., Leroux, J.C., Gurny, R., 1.998.** Biodegradable nanoparticles of poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. En: Lieberman, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S. (Eds.), Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. *Marcel Dekker, Inc, Nueva York*, 3, 163-193.
- Allémann, E., Leroux, J.C., Gurny, R., Doelker, E., 1.993b.** *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly (D,L-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.*, 10, 1732-1737.
- 15 **Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G., 1.996.** Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17, 93-102.
- Auvillain, M., Cavé, G., Fessi, H., Devissaguet, J.P., 1.989.** Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. *S. T. P. Pharma.*, 5, 738-744.
- 20 **Bugada, D.C., Rudin, A., 1.985.** Characterization of poly(vinyl alcohol). *J. App. Polym. Sci.*, 30, 4137-4147.
- Carpenter, J.F., Pikal, M.J., Chang, B.S., Randolph, T.W., 1.997.** Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm. Res.*, 14, 969-974.
- 25 **Chasteigner, S., Cavé, G., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1.996.** Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. *Drug Dev. Res.*, 116-124.
- De Chasteigner, S., Fessi, H., Cavé, G., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1.995.** Gastrointestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. *S. T. P. Pharma Sciences*, 5, 242-246.
- 30 **DeLuca, P.P., Boylan, J.C., 1.984.** Formulation of small volume parenterals. En: Avis, K.E., Lachman, L., Lieberman, H.A. (Eds.), Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications. *M DEKKER, Inc., Nueva York*, 1, 139-201.
- 35 **Douglas, S.J., Davis, S.S., Illum, L., 1.987.** Nanoparticles in drug delivery. *CRC Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Syst.*, 3, 233-260.
- 40 **Dunn, R.L., English, J.P., Strobel, J.D., Cowsar, D.R., Tice, T.R., 1.988.** Polymers in medicine III. *Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam*.
- Finley, J.H., 1.961.** spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings. *Anal. chem.*, 33, 1925-1927.
- 45 **Ford, A.W., Dawson, P.J., 1.993.** The effect of carbohydrate additives in the freeze-drying of alkaline phosphatase. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45, 86-93.
- Goldbach, P., Brochart, H., Wehrld, P., Stamm, A., 1.995.** Sterile filtration of liposomes: retention of encapsulation carboxyfluorescein. *Int. J. Pharm.*, 117,225-230.
- 50 **Hausberger, A.G., Kenley, R.A., DeLuca, P.P., 1.995.** Gamma irradiation effects on molecular weight and *in vitro* degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm. Res.*, 12, 851-856.
- 55 **Ibrahim, H., Bindschaedler, C., Doelker, E., Buri, P., Gurny, R., 1.992.** Aqueous nanodispersions prepared by saltingout process. *Int. J. Pharm.*, 87, 239-246.
- Jefferey, H., Davis, S.S., O'Hagan, D.T., 1.991.** The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. En: oil-in water emulsion solvent evaporation. *Int. J. Pharm.*, 77, 169-175.
- 60 **Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hino, T., Niwa, T., 1.998.** Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 41-48.
- 65 **Kreuter, J., 1983.** Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems III: materials, stability, toxicities, possibilities of targeting, and use. *Pharma. Acta Helv.*, 58, 242-249.

- Krishnamurthy, R., Lumpkin, J.A., 1998.** Stability of proteins during manufacture and release from biodegradable polymers. *Pharm. Techn.*, 28-34.
- Lee, S.C., Oh, J.T., Jang, M.H., Chung, S. I., 1999a.** Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J. Control. Res.*, 59, 123-132.
- Leroux, J.C., Allemann, E., Doelker, E., Gurny, R., 1995.** New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41, 14-18.
- Lidgate, D.M., Trattner, T., Shultz, R.M., Maskiewicz, R., 1992.** sterile filtration of a parenteral emulsion. *Pharm. Res.*, 9, 860-863.
- Mauduit, J., Vert, M., 1993.** Les polymères à base d'acides lactique et glycolique et la délivrance contrôlée des principes actifs. *S. T. P. Pharma. Sciences*, 3, 197-212.
- Mohr, D., Wolff, M., Kissel, T., 1999.** Gamma irradiation for terminal sterilization of 17K estradiol loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Control. Rel.*, 61, 203-217.
- Montanari, L., Costantini, M., Signoretti, E.C., Valvo, L., Santucci, M., Bartolomei, M., Fattibene, P., Onori, S., Faucitano, A., Conti, B., Genta, I., 1998.** Gamma irradiation effects on poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Rel.*, 56, 219-229.
- Quintanar-Guerrero, D.** Etude de nouvelles techniques d'obtention de suspensions de nanoparticules à partir de polymères préformés. 1997. University of Geneva. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., Doelker, E., 1996.** Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 143, 133-141.
- Randolph, T.W., 1997.** Phase separation of excipients during lyophilization: Effects on protein stability. *J. Pharm. Sci.*, 86, 1198-1202.
- Reich, G., 1998.** Ultrasound-induced degradation of PLA and PLGA during microsphere processing: influence of formulation variables. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 171.
- Rodrigues Jr, J.M., Fessi, H., Bories, C., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., 1995.** Primaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles: physicochemical study and acute tolerance in mice. *Int. J. Pharm.*, 126, 253-260.
- Rothen-Weinhold, A., Besseghir, K., Gurny, R., 1997.** Analysis of the influence of polymer characteristics and core loading on the *in vivo* release of a somatostatin analogue. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 5, 303-313.
- Sah, H., Chien, Y.W., 1995.** Role of low-molecular-weight polylactide and its copolymer in the acceleration of hydrolysis of PLGA(75:25) microcapsules. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact.*, 22, 776-777.
- Scholes, P.D., Coombes, A.G.A., Illum, L., Davis, S.S., Vert, M., Davies, M.C., 1993.** The preparation of sub-200 nm poly(lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, 25, 145-153.
- Smith, A., Hunneyball, I.M., 1986.** Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int. J. Pharm.*, 30, 215-220.
- Snowman, J.W., 1991.** Freeze drying of sterile products. En: Groves, M.J., Olson, W.P., Anisfeld, M.H. (Eds.), *Sterile pharmaceutical manufacturing: applications for the 1990's. Interpharm Press*, 1, 79-108.
- Tracy, M.A., Firouzabadian, L., Zhang, Y., 1995.** Effects of PLGA end groups on degradation. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 22, 786-787.
- Tracy, M.A., Ward, K.L., Firouzabadian, L., Wang, Y., Dong, N., Qian, R., Zhang, Y., 1999.** Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*. *Biomaterials.*, 20, 1057-1062.
- Vert, M., 1987.** Structure et comportement des polymères. Exemples des polymères biorésorbables. *S. T. P. Pharma.*, 3, 216-222.
- Vert, M., Schwach, G., Engel, R., Coudane, J., 1998.** Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers? *J. Control. Rel.*, 53, 92.
- Volland, C., Wolff, M., Kissel, T., 1994.** The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Rel.*, 31, 293-305.

ES 2 341 646 T3

Witschi, C., Doelker, E., 1.997. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 43, 215-242.

5 **Zheng, J.Y., Bosch, H.W., 1.997.** Sterile filtration of Nanocrystal™ drug formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23, 1087-1093.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 341 646 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartícula cargada con un fotosensibilizador que comprende una o más porfirinas verdes y uno o más polímeros de poliéster, en la que las nanopartículas son un vehículo de administración de liberación rápida del fotosensibilizador en un medio que contiene suero.
- 10 2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que dicha una o más porfirinas verdes se selecciona de entre BPD-MA, QLT 0074 ó QLT 0069.
- 10 3. Nanopartícula según la reivindicación 1 ó 2, en la que los polímeros se seleccionan de entre el copolímero de D,L-láctido y glicólido y el polímero de D,L-láctido.
- 15 4. Nanopartícula según la reivindicación 1 ó 2, en la que los polímeros son copolímero de D,L-láctido y glicólido.
- 15 5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, con un diámetro medio inferior a aproximadamente 200 nm.
- 20 6. Nanopartícula según la reivindicación 5, con un diámetro medio de entre 100 y 200 nm.
- 20 7. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adicionalmente un lioprotector.
- 25 8. Nanopartícula según la reivindicación 7, en la que el lioprotector es trehalosa.
- 25 9. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en forma liofilizada.
- 30 10. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las porfirinas verdes comprenden desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 20% en peso de la nanopartícula.
- 30 11. Nanopartícula según la reivindicación 10, en la que las porfirinas verdes comprenden desde aproximadamente un 5 hasta aproximadamente un 10% en peso de la nanopartícula.
- 35 12. Método para preparar nanopartículas cargadas con una porfirina verde, que comprende:
 - 35 (a) disolver una porfirina verde y uno o más polímeros de poliéster en un disolvente orgánico para formar una fase orgánica;
 - 40 (b) combinar la fase orgánica con una fase acuosa que contenga agua, un coloide estabilizante y una sal;
 - 40 (c) someter la mezcla a agitación mecánica enérgica para producir nanopartículas, en la que dicha agitación mecánica se realiza a 800 RPM o más; y
 - 45 (d) aislar las nanopartículas resultantes.
- 45 13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho polímero de poliéster es copolímero de D,L-láctido y glicólido y/o polímero de D,L-láctido.
- 50 14. Método según la reivindicación 12, en el que dicho polímero de poliéster es copolímero de D,L-láctido y glicólido.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que dicho disolvente orgánico es THF.
- 55 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que dicho coloide estabilizante es PVAL.
- 55 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que dicha agitación mecánica enérgica se da a más de 2.000 rpm.
- 60 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que dicho aislamiento se da mediante filtración de flujo cruzado.
- 60 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que comprende adicionalmente la filtración estéril de las nanopartículas.
- 65 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que comprende adicionalmente la liofilización de las nanopartículas.
- 65 21. Método según la reivindicación 20, en el que se añade un lioprotector antes de la liofilización.

ES 2 341 646 T3

22. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que el medio que contiene suero es un fluido corporal de un animal.

23. Nanopartícula según la reivindicación 22, en la que el medio que contiene suero es sangre humana.

24. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 22-23, con un tamaño medio de partícula menor que aproximadamente 200 nm de diámetro.

25. Nanopartícula según la reivindicación 24, en la que el tamaño medio de partícula se encuentra entre aproximadamente 100 nm y 200 nm de diámetro.

26. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 ó 22-25 para su uso en una terapia fotodinámica.

27. Nanopartícula según la reivindicación 26, en la que dicha terapia fotodinámica se da en un ser humano aquejado de un tumor o una neovascularización no deseada.

28. Composición farmacéutica que comprende la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 ó 22-25 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

29. Uso de una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 ó 22-25 para preparar una composición farmacéutica para su uso en una terapia fotodinámica.

30. Uso de la reivindicación 29, en la que dicha terapia fotodinámica se da en un ser humano aquejado de un tumor o una neovascularización no deseada.

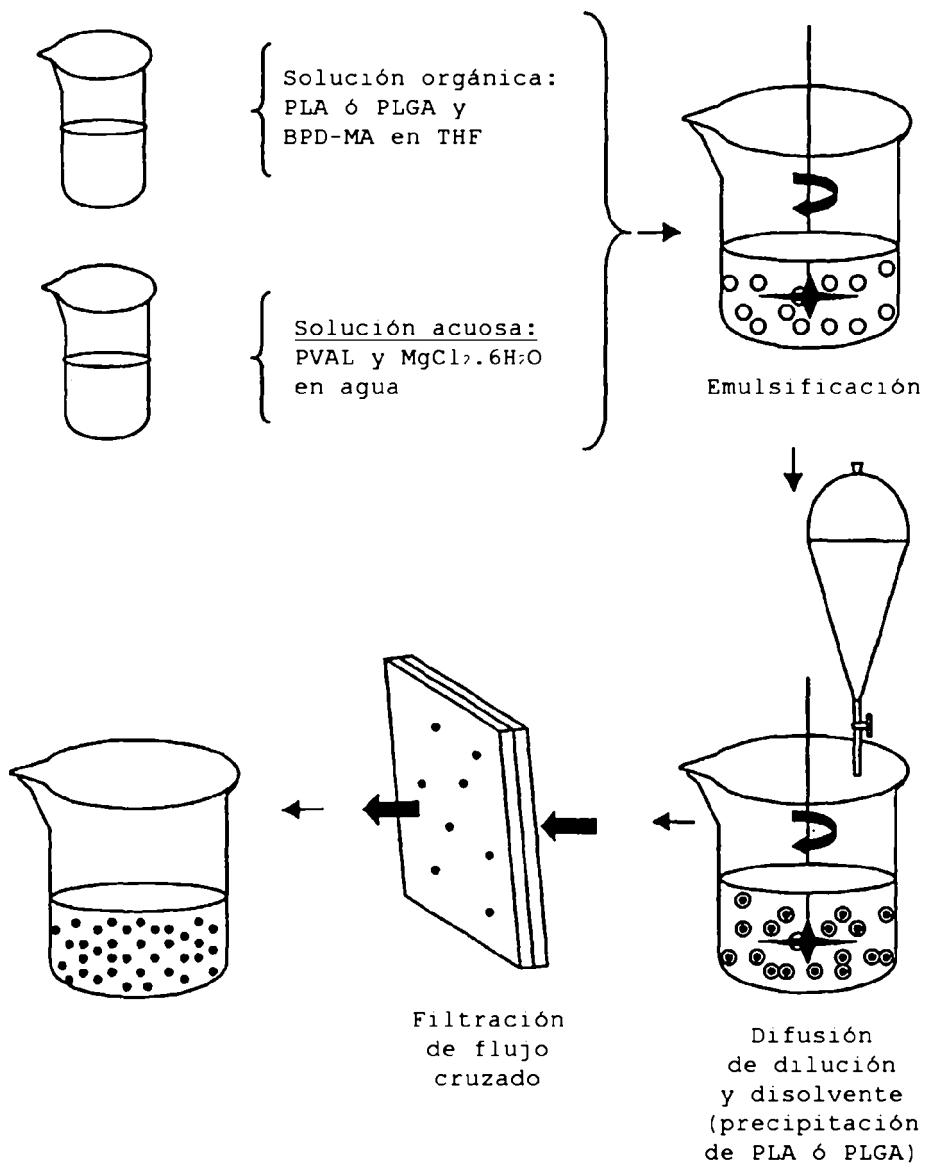


FIGURA 1

Figura 2

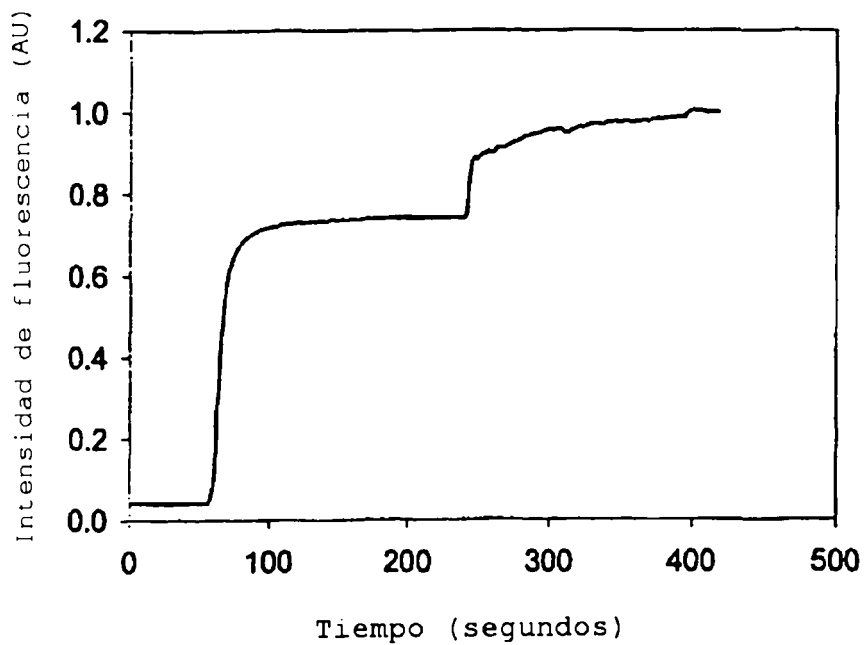
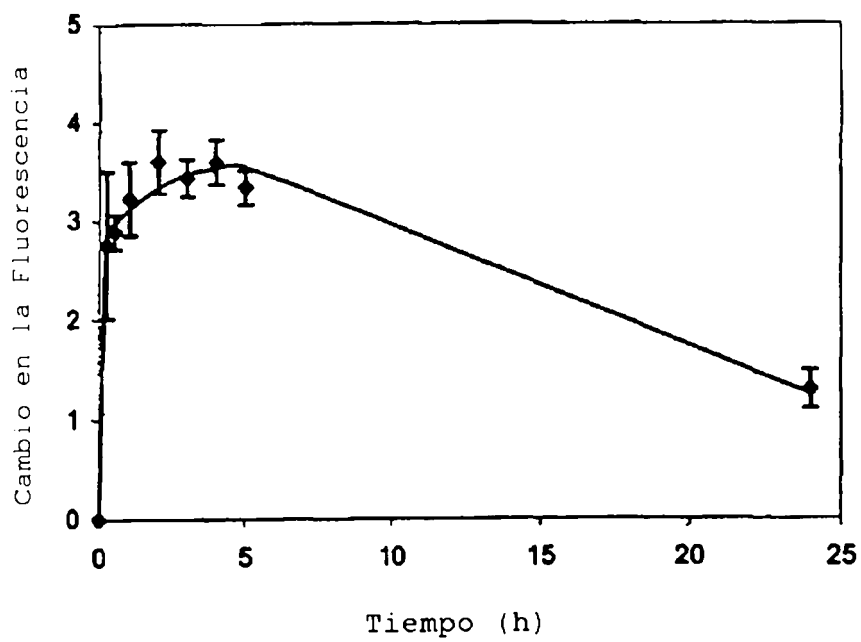


Figura 3



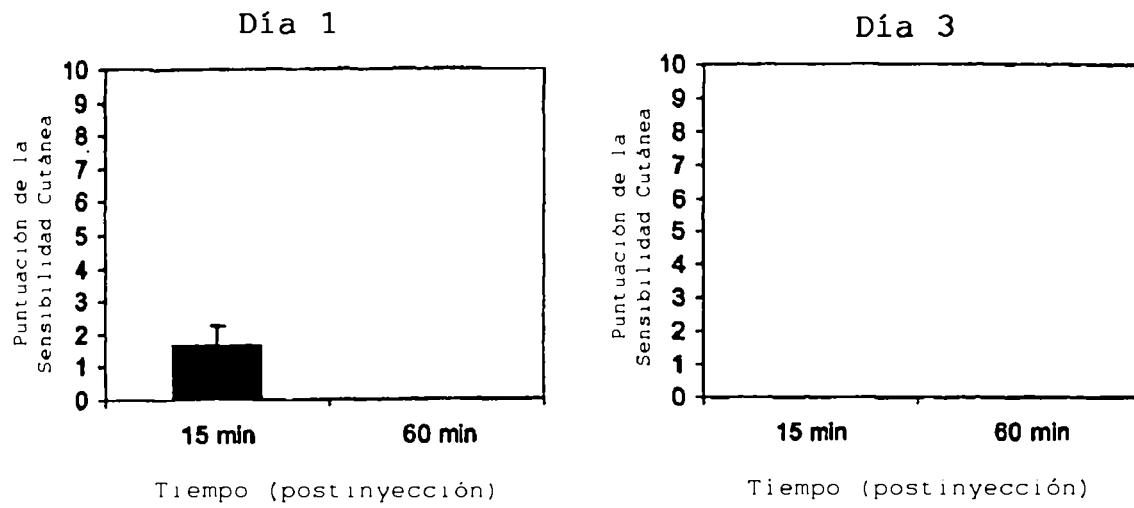


Figura 4