

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/001160 A1

(43) Fecha de publicación internacional
8 de enero de 2015 (08.01.2015)

WIPO | PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 38/12 (2006.01) *A61K 9/51* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070538
- (22) Fecha de presentación internacional:
2 de julio de 2014 (02.07.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
13382268.4 3 de julio de 2013 (03.07.2013) EP
- (71) Solicitantes: **BIOPRAXIS RESEARCH AIE** [ES/ES]; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **PRAXIS PHARMACEUTICAL, S.A.** [ES/ES]; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **FUNDACIÓ D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA DE LES ILLES BALEARS** [ES/ES]; Departamento de Desarrollo y Regeneración, Carretera de Soller km 12, E-07110 Bunyola, Baleares (ES). **UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA** [ES/ES]; Nanobiocel, Upv-faculty Of Pharmacy University Of The Basque Country, Paseo de la Universidad, 7, E-01006 Vitoria - Gasteiz, Alava (ES). **UNIVERSIDAD DE**

BARCELONA [ES/ES]; Feixa Llarga s/n, E-08907 Hospitalet, Barcelona (ES).

- (72) Inventores: **GAINZA LAFUENTE, Eusebio**; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **DEL POZO PEREZ, Angel**; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **GAINZA LUCEA, Garazi**; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **IBARROLA MORENO, Oihane**; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **VILLULLAS RINCON, Sílvia**; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **FERNANDEZ PLAGARO, Raúl**; C/Hermanos Lumiere 5-PT, E-01510 Miñano, Alava (ES). **BACHILLER PEREZ, Daniel**; Fisib, Departamento de Desarrollo y Regeneración, Carretera de Soller km 12, E-07110 Bunyola, Baleares (ES). **PEDRAZ MUÑOZ, José Luis**; Nanobiocel, Upv-faculty Of Pharmacy University Of The Basque Country, Paseo de la Universidad, 7, E-01006 Vitoria - Gasteiz, Alava (ES). **ESQUISABEL ALEGRIA, Amaya**; Nanobiocel, Upv-faculty Of Pharmacy University Of The Basque Country, Paseo de la Universidad, 7, E-01006 Vitoria - Gasteiz, Alava (ES). **PASTOR NAVARRO, Marta**; Nanobiocel, Upv-faculty Of Pharmacy University Of The Basque Country, Paseo de la Universidad, 7, E-01006 Vitoria - Gasteiz, Alava (ES). **FUSTE DOMINGUEZ, Ester**; Feixa Llarga s/n, E-08907

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: LIPID NANOPARTICLE OF POLYMYXIN

(54) Título : NANOPARTÍCULA LIPÍDICA DE POLIMIXINA

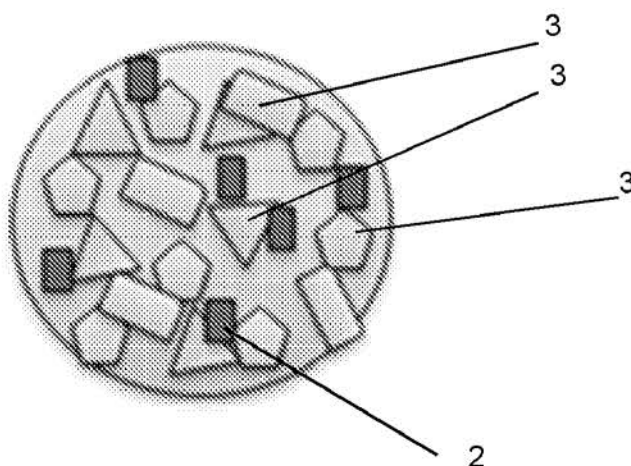


Figura 2

(57) Abstract: The invention relates to a lipid nanoparticle comprising at least one antibiotic from the polymyxin family, a lipid fraction and one or more surfactants, and to the use of the nanoparticle in the prevention and/or treatment of infections in the respiratory system.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con una nanopartícula lipídica que comprende al menos un antibiótico de la familia de las polimixinas, una fracción lipídica y uno o más tensioactivos, y el uso de la nanopartícula en la prevención y/o tratamiento de infecciones del árbol respiratorio.



WO 2015/001160 A1



Hospitalet, Barcelona (ES). **SANS SERRAMIT JANA, Eulalia**; Feixa Llarga s/n, E-08907 Hospitalet, Barcelona (ES). **GIL MARTIN, Iraida**; Feixa Llarga s/n, E-08907 Hospitalet, Barcelona (ES).

(74) **Mandatario: IGARTUA IRIZAR, Ismael**; Galbaian S. Coop., Polo de Innovación Garaia, Goiru Kalea 1, E-20500 Arrasate - Mondragon, Guipuzcoa (ES).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

- 1 -

DESCRIPCIÓN

“NANOPARTÍCULA LIPÍDICA DE POLIMIXINA”

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con una nanopartícula lipídica que comprende al menos un antibiótico de la familia de las polimixinas, una composición farmacéutica que comprende dicha nanopartícula y el uso de la nanopartícula en la prevención
10 y/o tratamiento de infecciones del árbol respiratorio.

ESTADO ANTERIOR DE LA TÉCNICA

15 Una de las enfermedades en la que mayor repercusión tienen las infecciones crónicas y recurrentes por bacterias gram negativas multi-resistentes (BGN-MR), por ejemplo, por la *Pseudomonas aeruginosa*, es la fibrosis quística. La persistencia de esta bacteria se asocia, entre otras causas, con su crecimiento en una biopelícula, la cual consiste en una estructura colectiva de bacterias que se adhiere a
20 superficies, revestida por una capa protectora que segregan las propias bacterias, y que aporta la capacidad de resistir de un modo más eficaz a biocidas y antibióticos, soportando dosis considerablemente mayores de productos antibacterianos, y provocando un deterioro de la función pulmonar.

25 Algunos antibióticos para el tratamiento de estas infecciones presentan efectos adversos por lo que la utilización de microsistemas o nanosistemas para administrar dichos antibióticos presentan un interés particular. En la literatura se describen diferentes usos de estos sistemas que comprenden alguno de estos antibióticos, como es el caso del documento US2009169635, en el que se describen unas
30 nanopartículas de polímeros biodegradables de tipo poliéster para su administración vía sistémica.

Debido a que la concentración local en el pulmón de agentes antimicrobianos o antibióticos es uno de los factores más importantes para la erradicación con éxito de

- 2 -

las bacterias, el epitelio alveolar y bronquial parece el lugar más interesante para la liberación de fármacos.

5 La administración directa de antibióticos a las vías aéreas inferiores mediante la administración de aerosoles y polvo seco presenta ventajas potenciales como la mayor concentración local que puede lograrse mediante deposición en la localización alveolar donde está la infección, y, por tanto, los fármacos inhalados pueden reducir la aparición de efectos adversos sistémicos al reducir la dosis administrada.

10

Las polimixinas son una familia de antibióticos que se comercializaron en las décadas de 1950 y 1960 pero cayeron posteriormente en desuso debido a sus efectos adversos y a la aparición de otros antibióticos frente a bacterias gram negativas (Luces y sombras en el uso de colistina: falta mucho por conocer. 15 Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2011, Volume 29, Issue 4). En los últimos años, debido al incremento de las infecciones producidas por bacterias BGN-MR junto con la ausencia de alternativas terapéuticas se ha dado lugar al resurgimiento del uso de los antibióticos de la familia de las polimixinas. No obstante, los pocos datos clínicos de eficacia y de seguridad de los que se dispone 20 dificultan asegurar si los regímenes de dosificación utilizados en la actualidad son los más adecuados.

A la vista de estos datos, existe, por tanto, una necesidad de desarrollar medicamentos para el tratamiento de infecciones en el árbol respiratorio que 25 superen los inconvenientes del estado de la técnica.

EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

30 Los inventores han desarrollado nanopartículas lipídicas que comprenden al menos un antibiótico de la familia de las polimixinas que son capaces de adherirse en o interactuar con la capa mucosa del tracto respiratorio o la biopelícula generada por las propias bacterias, favoreciendo que a una menor dosis terapéutica de antibiótico se obtengan unos resultados de concentración mínima inhibitoria óptimos.

35

- 3 -

Las nanopartículas de la invención están protegidas frente a una degradación prematura y presentan además una liberación sostenida del antibiótico en el epitelio alveolar y bronquial.

- 5 Por tanto, un aspecto de la invención es el de proporcionar una nanopartícula lipídica que comprende al menos un antibiótico de la familia de las polimixinas, una fracción lipídica que comprende uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en monoglicéridos y/o diglicéridos y/o triglicéridos y/o ácidos grasos y/o mezclas de los mismos.
- 10 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas lipídicas definidas anteriormente junto con uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de las nanopartículas lipídicas definidas anteriormente que comprende las siguientes etapas:
- a) Preparar una solución/mezcla con la fracción lipídica junto con al menos un antibiótico en un disolvente orgánico.
 - 20 b) Preparar una solución acuosa con uno o más tensioactivos.
 - c) Mezclar la fase oleosa a) y la fase acuosa b) para obtener una emulsión.
 - d) Dejar evaporar el solvente.
 - e) Lavar las nanopartículas obtenidas mediante centrifugación y/o ultrafiltración.
- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a la nanopartícula lipídica definida anteriormente, para su uso como medicamento.

- Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de las nanopartículas lipídicas definidas anteriormente que comprende las siguientes
- 30 etapas:
- a) Preparar una mezcla de los lípidos y al menos un antibiótico calentando a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión del lípido sólido.
 - b) Preparar una solución acuosa con uno o más tensioactivos.
 - 35 c) Calentar la solución acuosa b) a la misma temperatura que la fase oleosa a).

- 4 -

- d) Añadir la fase acuosa b) sobre la fase oleosa a) y mezclar para obtener una emulsión.
- e) Mantener a una temperatura $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta que los lípidos recristalicen dando lugar a las nanopartículas.
- 5 f) Lavar las nanopartículas obtenidas mediante centrifugación y/o ultrafiltración.

Las nanopartículas lipídicas de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones, en particular infecciones en el árbol respiratorio. Por tanto, otro aspecto de la invención se dirige a la nanopartícula lipídica definida anteriormente, para su
10 uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere a la nanopartícula lipídica definida anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones en el árbol respiratorio. Así, este aspecto se refiere al uso de la nanopartícula lipídica
15 definida anteriormente para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una infección, preferentemente en el árbol respiratorio, preferentemente causadas por *P. aeruginosa* y/o especies afines y/o microorganismos sensibles a las polimixinas.

20 Otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento y/o prevención de una infección, preferentemente en el árbol respiratorio, preferentemente causadas por *P. aeruginosa* y/o especies afines y/o microorganismos sensibles a las polimixinas, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la nanopartícula lipídica definida anteriormente, junto con excipientes o portadores
25 farmacéuticamente aceptables, en un sujeto en necesidad de ese tratamiento y/o prevención, incluyendo un humano.

En este sentido, los estudios realizados por los inventores han demostrado la capacidad de estas nanopartículas lipídicas, así como las composiciones
30 farmacéuticas y/o los medicamentos que comprenden estas nanopartículas, para:

- obtener una nanopartícula lipídica estable y con efecto de liberación sostenida y/o regulada del antibiótico,
- proteger el antibiótico de una degradación prematura,
- obtener un tamaño de partícula adecuado para su administración en el tracto
35 respiratorio,

- 5 -

- tener la capacidad para penetrar en la biopelícula generada por las propias bacterias, y
 - obtener unos mejores valores de seguridad y eficacia que el antibiótico libre.
- 5 Estas y otras ventajas y características de la invención se harán evidentes a la vista de las figuras y de la descripción detallada de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

Figura 1. Representación gráfica de las nanopartículas lipídicas cargadas con el antibiótico en el que la fracción lipídica comprende lípidos sólidos a temperatura ambiente.

15

Figura 2. Representación gráfica de las nanopartículas lipídicas cargadas con el antibiótico en el que la fracción lipídica comprende una mezcla de lípidos sólidos a temperatura ambiente y lípidos líquidos a temperatura ambiente.

20

Figura 3. Fotografía microscópica de una realización de las nanopartículas lipídicas de la presente invención.

Figura 4. Curva de liberación de antibiótico en el tiempo de las nanopartículas lipídicas.

25

Figura 5. Imagen de la distribución pulmonar de microesferas fluorescentes tras su administración a un ratón CD1.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30

La nanopartícula lipídica que han desarrollado los inventores comprende al menos un antibiótico de la familia de las polimixinas, una fracción lipídica que comprende uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en monoglicéridos y/o diglicéridos y/o triglicéridos y/o ácidos grasos y/o mezclas de los mismos y uno o

35 más tensioactivos.

- 6 -

En el contexto de la presente invención, el término "nanopartícula lipídica" se refiere a una matriz que comprende un núcleo de naturaleza lipídica y/o lipofílica, preferentemente, lípido solidificado, que podría comprender nanocompartimentos
5 conteniendo el lípido en estado líquido, rodeado por una fase hidrofílica que encapsula el núcleo.

En el alcance de la invención se incluyen las nanopartículas que comprenden los lípidos sólidos a temperatura ambiente, también conocidas como nanopartículas
10 lipídicas sólidas y los lípidos nanoestructurados, aquellas que comprenden una mezcla de lípidos sólidos y de líquidos a temperatura ambiente.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención se caracterizan por presentar un tamaño promedio, aproximadamente, entre 10nm y, aproximadamente,
15 1000 nm, preferentemente, entre, aproximadamente, 100 nm y, aproximadamente, 500 nm.

Por "tamaño promedio" se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas lipídicas de la presente invención. El tamaño promedio se puede
20 medir por procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte de los ejemplos más adelante.

El tamaño de la partícula es uno de los factores que determina la liberación sostenida del antibiótico. En general, el antibiótico situado en la superficie de la
25 nanopartícula es el primero en liberarse. A menor tamaño de nanopartícula, mayor superficie específica de interacción, por lo que habrá una mayor liberación inicial de antibiótico.

En otra realización, las nanopartículas presentan una carga superficial (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede variar desde, aproximadamente, -30
30 mV a, aproximadamente, -5 mV y preferentemente entre -30 mV y -16 mV. Generalmente, la carga superficial es uno de los parámetros que afectan a la estabilidad de las nanopartículas lipídicas. El hecho de que estén cargadas negativamente o positivamente favorecerá que las fuerzas de repulsión entre las

- 7 -

nanopartículas eviten las aglomeraciones presentando mejores propiedades de dispersión.

5 Considerando la carga positiva de los lipopolisacáridos de las membranas bacterianas presentes en la biopelícula generada por las propias bacterias y/o presentes en la mucosa pulmonar, la carga superficial negativa de las nanopartículas de la presente invención favorecen la unión nanopartícula- bacteria, optimizando la retención y adhesión de la nanopartícula en el lugar de acción, favoreciendo un efecto sostenido y terapéutico del antibiótico mejor.

10

En otra realización, las nanopartículas de la invención presentan unos valores de índice de polidispersión (PDI) iguales o inferiores a 0.5. Este índice nos da una idea de la diversidad de tamaños de nanopartícula existentes en una mezcla. Cuanto más próximo esté a cero más homogéneas serán las nanopartículas, indicativo de una distribución homogénea de tamaño de los lotes de fabricación.

15

Tanto el tamaño medio, como el potencial Z, como el valor PDI de las nanopartículas se ve influenciado principalmente por la cantidad del componente lipídico, por la cantidad de tensioactivos y por los parámetros del procedimiento de preparación, tal como la potencia y tipo de agitación, la temperatura de ambas fases o la duración de la fase de mezclado.

20

Fracción lipídica

25 En una realización particular, la nanopartícula lipídica de la presente invención comprende como fracción lipídica al menos un lípido sólido a temperatura ambiente que forma parte del núcleo de la nanopartícula.

30 Para los fines de la invención, la temperatura ambiente es de 20-25 °C. No obstante, en el contexto de la presente invención, se entiende por "lípido sólido a temperatura ambiente" aquel lípido que se mantiene en forma sólida por debajo de 45 °C, pudiendo ser saturado o insaturado. En dicha definición, se pueden incluir, sin limitación, triglicéridos (por ejemplo triestearina), y/o mono o diglicéridos (por ejemplo derivados y mezclas de mono y diglicéridos) y/o ácidos grasos (por ejemplo ácido esteárico) o sus derivados y/o sus mezclas, esteroides (por ejemplo

35

- 8 -

colesterol) y ceras (por ejemplo cetil palmitato). Cada ácido graso de estos glicéridos, así como los ácidos grasos por separado se suelen caracterizar por tener cadenas de entre 10 y 28 átomos de carbono. En la definición de derivados de ácidos grasos se incluyen aquellos ácidos grasos, sus ésteres o sus amidas que
5 presentan grupos hidroxilo como sustituyentes de la cadena hidrocarbonada.

En una realización particular, la fracción lipídica comprende una mezcla de monoglicéridos, diglicéridos y/o triglicéridos.

10 En una realización preferente, la fracción lipídica comprende una mezcla de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de palmitoestearato de glicerilo (por ejemplo, Precirol® ATO 5).

En otra realización particular, la fracción lipídica de la nanopartícula comprende una
15 mezcla de uno o más lípidos sólidos a temperatura ambiente y uno o más lípidos líquidos a temperatura ambiente.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "lípidos líquidos a temperatura ambiente" aquel lípido que se mantiene en forma líquida por debajo de
20 45 °C, pudiendo ser saturado o insaturado. En dicha definición, se pueden incluir, sin limitación, aceites, y/o triglicéridos, y/o monoglicéridos y/o diglicéridos y/o los ácidos grasos y/o ésteres de ácidos grasos y/o sus mezclas. Cada ácido graso de estos glicéridos, así como los ácidos grasos por separado se suelen caracterizar por tener cadenas de menos de 10 átomos de carbono.

25

En una realización particular, la fracción lipídica líquida comprende triglicéridos.

En una realización preferente, se emplea como lípidos líquidos un triglicérido de ácido caprílico y de ácido cáprico (por ejemplo Mygliol 812).

30

El lípidos líquidos aporta una estructura menos ordenada aumentando la capacidad de carga del antibiótico en el núcleo de la nanopartícula.

Las figuras 1 y 2 ofrecen una representación gráfica de ejemplos particulares de las
35 nanopartículas lipídicas donde la primera figura comprende lípidos sólidos 1 junto

- 9 -

con el antibiótico 2, y la segunda comprende una mezcla 3 de lípidos sólidos y líquidos junto con el antibiótico 2.

En una realización de la invención, la relación en peso (peso/peso) de lípido líquido respecto al lípido sólido está comprendida, aproximadamente, entre 0.5:10 y, aproximadamente, 5:10.

En una realización de la invención, la relación en peso (peso/peso) de lípido líquido respecto al lípido sólido es de aproximadamente 1:10.

10

El uso de los lípidos sólidos y líquidos aportan las siguientes ventajas a la nanopartícula:

- tolerancia en el organismo y tejidos mejorada debido a la utilización de lípidos aceptados fisiológicamente,
- 15 - posibilidad de encapsular tanto fármacos lipófilos como hidrófilos, utilizando diferentes métodos de preparación,
- no muestran toxicidad biológica, y
- es posible modular la liberación del antibiótico según la necesidad. Las nanopartículas con una cubierta rica en antibiótico presentan una importante liberación inicial mientras que las nanopartículas con un núcleo rico en
- 20 - fármaco permiten una liberación sostenida del mismo.

Tensioactivo

25 Como se ha dicho anteriormente, las nanopartículas de la invención comprenden uno o más tensioactivos. En una realización particular, la fase hidrofílica de las nanopartículas que rodea al núcleo lipofílico comprende un tensioactivo. En el contexto de esta invención, un tensioactivo es un emulgente o emulsionante que reduce la tensión superficial de las diferentes fases que se requieren para la

30 fabricación de las nanopartículas consiguiendo una mejor interposición de las mismas y así, la formación de las nanopartículas.

Los tensioactivos pueden ser catiónicos, iónicos o no iónicos y su clasificación dependerá de la carga que posea la parte de la superficie. Ejemplos de

35 tensioactivos catiónicos incluyen, sin limitación, cetrimida y/o cloruro de cetilpiridinio;

- 10 -

ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen, sin limitación, docusato sódico, fosfolípidos y/o lauril sulfato sódico

Por el término "tensioactivo no iónico" se entiende aquél compuesto sin ninguna
5 carga neta, que presenta una parte hidrófoba y una parte hidrofílica.

En una realización preferente, la nanopartícula comprende al menos un tensioactivo no iónico cuyas funciones principales son controlar el tamaño de partícula y conferir estabilidad evitando la formación de agregados. Ejemplos de tensioactivos no
10 iónicos incluyen, sin limitación, polisorbatos, copolímeros de polietilenglicol y/o copolímeros de polipropilenglicol. En una realización preferida, los tensioactivos no iónicos son polisorbato 80 y/o poloxamer.

En una realización particular, la proporción de tensioactivo no iónico está
15 comprendida entre 0,5% y 2% en peso respecto al peso total de la nanopartícula, preferentemente 1%.

Antibiótico

20 Un antibiótico o antimicrobiano es un agente que actúa contra infecciones bacterianas bien inhibiendo el crecimiento de la bacteria o dando lugar una cadena de acontecimientos bioquímicos que desembocarán en la lisis de la bacteria.

En la presente invención, la nanopartícula lipídica comprende al menos un
25 antibiótico de la familia de las polimixinas como son la polimixina A, polimixina B, polimixina C, polimixina D y polimixina E.

En una realización preferente, la nanopartícula lipídica comprende al menos un
30 antibiótico del tipo de colistina o colistimetato sódico.

La liberación del antibiótico así como la acción antibacteriana se pueden regular mediante la relación en peso del antibiótico respecto a la fracción lipídica. En una
realización particular, la relación en peso del antibiótico respecto a la fracción
lipídica es desde, aproximadamente, 0,25:10, hasta aproximadamente, 4:10 siendo
35 preferentemente de aproximadamente 1:10.

La acción antibacteriana de un antibiótico se puede medir mediante la concentración inhibitoria mínima, la cual consiste en la concentración del antibiótico requerida para impedir el crecimiento bacteriano a partir de la incubación de 10^{4-5} bacterias en fase
5 de crecimiento rápido, en un medio libre de proteínas con pH 7,2, aerobio, durante un periodo de incubación de una noche. Este término se utiliza para determinar la sensibilidad bacteriana a un agente antibiótico específico.

El término sensible en el contexto de la infección significa una inhibición del
10 crecimiento del microorganismo y/o muerte del microorganismo, en el caso de un tratamiento a la dosis terapéutica.

Las relaciones en peso de antibiótico-fracción lipídica de las diferentes realizaciones de la presente invención han demostrado una concentración inhibitoria mínima
15 menor que el antibiótico libre. Este hecho además de ser una ventaja de costes puesto que se requiere una menor cantidad de antibiótico para un mismo efecto terapéutico, favorece una menor probabilidad de resistencias bacterianas adquiridas.

20 Por el término resistencia bacteriana adquirida en el contexto de la invención se entiende aquella resistencia adquirida por la bacteria a través de la adquisición de genes de resistencia de otras bacterias y/o por procesos de mutación. La resistencia bacteriana está directamente relacionada, entre otras causas, con el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antibacteriana.

25

Procedimiento de preparación

Las nanopartículas lipídicas de la presente invención se pueden preparar mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente o mediante la técnica de
30 homogenización por fusión por calor.

La primera técnica comprende las siguientes etapas:

- a) Preparar una solución/mezcla con la fracción lipídica junto con al menos un antibiótico en un disolvente orgánico.
- 35 b) Preparar una solución acuosa con uno o más tensioactivos.

- 12 -

- c) Mezclar la fase oleosa a) y la fase acuosa b) para obtener una emulsión.
 - d) Dejar evaporar el solvente.
 - e) Lavar las nanopartículas obtenidas mediante centrifugación.
- 5 En una realización particular, la fracción lipídica se disuelve en una solución orgánica entre el 1 y el 10% (peso/volumen), preferentemente entre 3 y 7 % y muy preferentemente al 5% junto con al menos un antibiótico. Por otro lado, se prepara una solución acuosa de al menos un tensioactivo. Se añade la fase acuosa sobre la oleosa y la mezcla se emulsiona mediante sonicación durante un tiempo
- 10 determinado. El tamaño, el índice de polidispersión y la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas dependerán de la potencia de sonicación y del tiempo de sonicación. Preferentemente se sónica entre 10W y 30W y muy preferentemente entre 15 W y 25W durante entre 15 segundos y 40 segundos, preferentemente entre 25 segundos y 35 segundos y muy preferentemente entre 29 segundos y 31
- 15 segundos. Una vez obtenida la emulsión se deja evaporar el solvente bajo agitación magnética durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la evaporación, las nanopartículas obtenidas se lavan centrifugando y filtrando entre 1 y 10 veces, preferentemente entre 2 y 5 veces y muy preferentemente 3 veces.
- 20 La segunda técnica comprende las siguientes etapas:
- a) Preparar una mezcla de los lípidos y al menos un antibiótico calentando a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión del lípido sólido.
 - b) Preparar una solución acuosa con uno o más tensioactivos.
 - c) Calentar la solución acuosa b) a la misma temperatura que la fase oleosa a).
 - 25 d) Añadir la fase acuosa b) sobre la fase oleosa a) y mezclar para obtener una emulsión.
 - e) Mantener a una temperatura $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta que los lípidos recristalicen.
 - f) Lavar las nanopartículas obtenidas mediante centrifugación/ultrafiltración.
- 30 En una realización particular, por una parte se mezclan los lípidos sólidos y/o líquidos y los antibióticos, y se calientan a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión del lípido sólido. Por otro parte, se prepara una solución acuosa de al menos un tensioactivo. La solución oleosa y la solución acuosa se calientan a la misma temperatura, y una vez que ambas fases alcanzan la misma temperatura se
- 35 añade la solución acuosa sobre la oleosa. La mezcla se emulsiona mediante

- 13 -

sonicación. Al igual que en el método anterior, el tamaño, el índice de polidispersión y la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas dependen de la potencia de sonicación y el tiempo de sonicación. Preferentemente se sónica entre 10W y 30W y muy preferentemente entre 15W y 25W durante entre 10 segundos y 30 segundos, 5 preferentemente entre 12 segundos y 16 segundos y muy preferentemente entre 14 segundos y 15 segundos. La emulsión obtenida se almacena como mínimo, entre 5 horas y 30 horas, preferentemente entre 10 horas y 20 horas y muy preferentemente entre 11 horas y 13 horas, muy preferentemente 12 horas entre 1°C y 10°C, preferentemente entre 2°C y 6°C y muy preferentemente entre 3°C y 5°C. En este 10 periodo, los lípidos se recristalizan formando las nanopartículas. Pasado el tiempo, se lavan centrifugando y filtrando entre 1 y 10 veces, preferentemente entre 2 y 5 veces y muy preferentemente 3 veces, entre 1000 rpm y 3500 rpm, preferentemente a 2000 rpm y 3000 rpm y muy preferentemente sobre 2500 rpm durante entre 10 minutos y 30 minutos, preferentemente entre 12 minutos y 16 minutos y muy 15 preferentemente entre 14 minutos y 15 minutos. Una de las ventajas de este método es que no se emplean solventes orgánicos, evitando así la necesidad de realizar ensayos de determinación de trazas de solventes orgánicos previo a la comercialización de las nanopartículas para consumo humano.

20 Un aspecto de esta invención se dirige al producto obtenible por las técnicas descritas anteriormente.

Liofilización

25 En una realización particular, la nanopartícula lipídica es una nanopartícula liofilizada. La liofilización permite obtener un polvo seco de las nanopartículas lipídicas, el cual le aporta una mayor estabilidad que las nanopartículas lipídicas en suspensión, ya que evita la degradación de la nanopartícula y la liberación anticipada del antibiótico a la solución en el que las nanopartículas están 30 suspendidas.

La liofilización se puede realizar por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte de los ejemplos más adelante.

35

- 14 -

En una realización, la nanopartícula lipídica de la presente invención comprende un crioprotector. El crioprotector favorece la estabilización de las nanopartículas durante el proceso de congelamiento del proceso de liofilización. Este crioprotector se puede seleccionar, sin limitación, entre SiO₂ coloidal, glicina, lactosa, manitol, 5 trehalosa, rafinosa, bicarbonato sódico y borato sódico.

En una realización preferente, la nanopartícula comprende la trehalosa como crioprotector.

10 En una realización, la nanopartícula lipídica comprende entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 20% de crioprotector en peso respecto al peso de la nanopartícula lipídica, preferentemente entre un 5% y 15%.

Infeción

15

Un aspecto de la invención se dirige a la nanopartícula lipídica de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la infección, preferentemente de una infección en el árbol respiratorio.

20 Otro aspecto de la invención se dirige al uso de la nanopartícula lipídica de la invención, para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la infección, preferentemente de una infección en el árbol respiratorio.

25 Otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento o prevención de una infección, preferentemente de una infección en el árbol respiratorio, que comprende en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la nanopartícula lipídica definida anteriormente, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, en un sujeto en necesidad de ese tratamiento y/o prevención, incluyendo un humano.

30

El término infección incluye cualquier infección por bacterias gram negativas y/o bacterias o microorganismos sensibles a los antibióticos de la familia de las polimixinas.

- 15 -

El término árbol respiratorio incluye a la cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea, bronquio primario y pulmones.

5 El término "prevención o tratamiento" en el contexto de la especificación significa la administración de las nanopartículas según la invención para preservar la salud en un paciente que sufre o está en riesgo de sufrir una infección bacteriana anteriormente descrita. Dichos términos también incluyen la administración de las nanopartículas según la invención para prevenir, mejorar, aliviar o eliminar uno o más síntomas asociados a la infección bacteriana. El término "mejorar" en el
10 contexto de esta invención se entiende que significa cualquier mejora en la situación del paciente tratado, o bien subjetiva (sensación de o en el paciente) o bien objetivamente (parámetros medidos).

15 En una realización particular, la infección en el árbol respiratorio se debe a la *Pseudomonas aeruginosa*.

20 La nanopartícula de la invención ha demostrado su capacidad de adherirse a la biopelícula generada por la bacteria o la propia mucosidad del tejido del árbol respiratorio. Así, en una realización particular, la invención se dirige al uso de la nanopartícula lipídica de la invención a la infección pulmonar asociada a la fibrosis quística y/o la bronquiectasia.

25 Las nanopartículas lipídicas de la presente invención, pueden estar formando parte de una composición farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida, semi-sólida o líquida para aplicación por vía digestiva (enteral, sublingual o rectal), por vía tópica (transdérmica u oftálmica), por vía parenteral (intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal) o administración directa en el árbol respiratorio.

30 La composición farmacéutica comprende la nanopartícula lipídica junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, en un sujeto en necesidad de ese tratamiento y/o prevención, incluyendo un humano. El experto en la materia puede determinar qué componentes adicionales se pueden utilizar y si son necesarios, siendo muchos de ellos de uso común en composiciones farmacéuticas.

- 16 -

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" en el contexto de esta invención se refiere a la cantidad de composición que una vez administrado, es suficiente para prevenir o tratar uno o más síntomas derivadas de la infección bacteriana. La dosis particular administrada según la presente invención será determinada según las
5 circunstancias particulares que rodean al caso, incluyendo el compuesto administrado, la ruta de administración, la condición particular que se trata y las consideraciones similares.

La expresión "excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a
10 materiales, composición o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. Debe también ser adecuado para su uso en contacto con los tejidos u órganos humanos y animales sin una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros
15 problemas o complicaciones acorde con una relación beneficio/ riesgo razonable.

La composición farmacéutica puede comprender otros ingredientes como moduladores de la viscosidad, conservantes, solubilizantes, en el que se incluyen, sin limitación, ciclodextrinas, lecitinas y/o monoestearato de glicerina,
20 antifloculantes, en el que se incluye, sin limitación, leucina, y/o estabilizantes, en el que se incluyen, sin limitación, alginatos, ácido algínico y/o trehalosa. Estos componentes serán adicionados a la fase lipofílica o hidrofílica dependiendo de la naturaleza de los mismos.

25 En una realización particular, la composición farmacéutica comprende las nanopartículas lipídicas de polimixina, un crioprotector, un agente antiaglomerante y otros excipientes. La presentación farmacéutica puede ser un polvo para ser nebulizado en solución o en polvo seco para su administración directa.

30 En una realización preferente, se administra en el tracto respiratorio, mediante la inhalación.

Estas administraciones mediante inhalación son preparaciones líquidas o sólidas que contienen la nanopartícula y/o composición farmacéutica y/o medicamento de la
35 invención sola o junto con más fármacos. El tamaño de las partículas destinadas a

- 17 -

ser inhaladas debe ser ajustado para localizar su repartición en la parte inferior del árbol respiratorio y controlado por métodos apropiados para la determinación del tamaño de las partículas. El experto en la materia puede determinar que procesos y/o dispositivos pueden aplicarse para una administración óptima mediante vapores
5 o aerosoles o polvos.

En otro aspecto de la invención, el tamaño de partícula inhalada está comprendida entre 1 μm y 10 μm , preferentemente entre 2 μm y 8 μm y más preferentemente entre 3 μm y 5 μm . Estos tamaños permiten una perfecta deposición alveolar y
10 retención pulmonar de la cantidad terapéuticamente efectiva. En una realización particular estos tamaños se logran agregando las nanopartículas, en el caso de su aplicación como polvo seco, o generando un aerosol con el portador apropiado en el caso de ser administradas mediante nebulización.

15 A continuación, se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención, no obstante, no se deben interpretar como limitativos del objeto de la invención tal como está definido en las reivindicaciones.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de nanopartículas lipídicas con antibiótico mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente

25 Ejemplo 1a:

Se mezclaron 10 mg de Colistimetato sódico en una disolución de 100 mg de diesterato de glicerilo, (por ejemplo Precirol[®] ATO 5) al 5% en diclorometano (volumen final 2 mL).

Por otro lado, se preparó una solución acuosa de los tensioactivos (Poloxamer 188 y
30 Polisorbato 80 al 1% cada uno). Se añadió la fase acuosa sobre la fase oleosa, y la mezcla fue emulsionada mediante sonicación a 20 W durante 30 segundos. Posteriormente se dejó bajo agitación magnética durante dos horas para que evaporara el solvente.

Tras la evaporación las nanopartículas obtenidas se lavaron centrifugando 3 veces a
35 2500 rpm durante 15 minutos utilizando filtros Amicon[®] Ultra (Millipore).

Ejemplo 1b:

Una parte de estas nanopartículas fueron liofilizadas sometiéndolas a las siguientes etapas:

5

- a) Adición de un 15% de trehalosa respecto al peso total de la fracción lipídica.
- b) Congelación a -20°C y posteriormente a -80°C.
- c) Congelación a -50°C, a 10000 mbar de presión durante 3 horas.
- d) Vacío a -50°C hasta obtener una presión de 0.20 mbar.
- 10 e) Secado a -50°C a 0.20 mbar de presión durante 5 horas.
- f) Secado a 20°C a 0.20 mbar de presión durante 7 horas.
- g) Secado a 20°C a presión ambiental durante 24 horas.

15 *Ejemplo 2: Preparación de nanopartículas lipídicas con antibiótico mediante la técnica de homogenización por fusión por calor.*

Ejemplo 2a:

20 Se preparó una mezcla de 1000 mg de Precirol® ATO 5 y Miglyol® 812 en una relación 10:1 junto con 100 mg de colistimetato sódico, a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión del lípido sólido.

Por otro lado, se preparó una solución acuosa del tensioactivo (Poloxamer 188 al 0,6 % y Polisorbato 80 al 1,3%).

25

La solución lipídica y la acuosa fueron calentadas a la misma temperatura (aproximadamente, a una temperatura entre 5°C y 10°C superior a la temperatura de fusión de los lípidos).

30 Se añadió la fase acuosa sobre la fase oleosa, y la mezcla fue emulsionada mediante sonicación a 20W durante 15 segundos. La emulsión obtenida fue almacenada durante 12 horas a 4°C para que los lípidos pudieran recristalizarse y formar las nanopartículas.

Las nanopartículas obtenidas se lavaron centrifugando 3 veces a 2500 rpm durante 35 15 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Ejemplo 2b:

Una parte de estas nanopartículas fueron liofilizadas sometiendo a las etapas citadas en el ejemplo 1b.

5

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia): Preparación de nanopartículas lipídicas sin antibiótico

Se prepararon varios lotes de nanopartículas lipídicas sin antibiótico, con diferentes relaciones en peso de lípido líquido respecto a lípido sólido según el método descrito en el ejemplo 2. Las relaciones fueron las siguientes: 0,5:10; 1:10; 2,5:10 y 5:10.

10

Ejemplo 4 Caracterización de las nanopartículas

15

Se caracterizaron el tamaño de la partícula y el potencial zeta mediante un Zetasizer Nano ZS. En la siguiente tabla se describen los resultados medios obtenidos con los lotes fabricados según los ejemplos 1,2 y 3:

Lotes	Relación Lípido líquido- lípido sólido	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	Índice de polidispersión (PDI)
Ejemplo 1 a	0:10	196±20	-20±1	0,27
Ejemplo 1 b	0:10	303±39	-21±2	0,27
Ejemplo 2a	1:10	219±23	-24±1	0,33
Ejemplo 2 b	1:10	500±42	-23±2	0,55
Ejemplo 3	0,5:10	397±44	-16±1	0,35
Ejemplo 3	1:10	248±46	-25±2	0,38
Ejemplo 3	2,5:10	401±56	-31±2	0,46
Ejemplo 3	5:10	396±56	-31±1	0,46

20

De esta tabla se puede observar que se han obtenido nanopartículas con un tamaño, potencial Z y PDI óptimos para una buena estabilidad y homogeneidad de las nanopartículas.

25

Ejemplo 5: Eficacia de encapsulación.

- 20 -

Se determinó la eficacia de encapsulación del antibiótico determinando la cantidad de antibiótico presente en el sobrenadante tras el proceso de lavado descritos en el ejemplo 1 y 2. El antibiótico presente en el sobrenadante fue analizado por HPLC utilizando un Waters 1525 HPLC Binary Pump (Waters Corp., Milford, USA), un
5 detector ultravioleta Waters 2487 e un inyector automático Waters 717 plus. El sistema se controlaba por el software Empower. La columna seleccionada fue Novapak C 18 x 150 mm con un tamaño de poro de 4 µm.

La fase móvil estaba constituida de una solución acuosa al 77% y de acetonitrilo al 23%. La fase acuosa fue preparada disolviendo (7,1 g) sulfato de sodio, (0,6 g)
10 ácido acético y (2,2 g) ácido fosfórico y ajustado a un pH 2,5 con trietilamina para 1litro de solución acuosa. El colistimetato sódico se detectó a una longitud de onda de 206 nm. El flujo era de 1,5 ml/min para una elución isocrática. Se inyectaron 50 µl de muestra disuelta en agua. Se vio que el ensayo era lineal para 100-800 µg/ml no detectándose ninguna interferencia.

15

La eficacia de encapsulación fue determinada por la siguiente fórmula:

$$EE(\%) = 100 * (\text{cantidad inicial de antibiótico} - \text{cantidad de antibiótico no encapsulado}) / \text{cantidad inicial de antibiótico}.$$

20

Los lotes fabricados según el método de fabricación descrito en el ejemplo 1 dieron valores medios de 80±7%, y los lotes fabricados según el método descrito en el ejemplo 2 de 95±4%. Estos valores son indicativos de que la efectividad del procedimiento de preparación está en unos valores próximos al 100%, asegurando
25 un aprovechamiento máximo del antibiótico añadido al proceso de fabricación.

Ejemplo 6: Ensayos in vitro para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

30 100 µl de una concentración de 10⁴ Unidades formadoras de Colonias (CFU) /ml de 31 cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de 31 pacientes con fibrosis quística, de las cuales, 13 cepas eran productoras de mucosa, fueron incubadas durante 24h a 37°C en un medio Caldo Mueller Hinton con concentración ajustada de cationes (MHBCA), correspondientes entre 20 mg y 25 mg por litro de Calcio y entre 10 mg y
35 12,5 mg por litro de magnésico, que aseguraban la reproducibilidad de los

- 21 -

resultados para *P.aeruginosa*, en presencia de Colistimetato sódico, y nanopartículas obtenidas según el ejemplo 1b y 2b, en diferentes concentraciones (menos de 0,25, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 32 µg/ml).

5 Para el colistimetato sódico, para el 48% de las cepas se obtuvo una MIC de 2 µg/ml, para el 25% una MIC de 1 µg/ml y para el 16% una MIC de 0,5 µg/ml. El restante obtuvo una MIC de 4 µg/ml.

10 En el caso de las nanopartículas obtenidas según el ejemplo 1b, para el 52% de las cepas se obtuvo una MIC de 2 µg/ml, para el 25% se obtuvo una MIC de 1 µg/ml, para el 13% se obtuvo una MIC de 0,5 µg/ml y para el 3% una MIC menor a 0,25 µg/ml. Para el restante de las cepas se obtuvo una MIC de 4 µg/ml.

15 En el caso de las nanopartículas obtenidas según el ejemplo 2b, para el 42% de las cepas se obtuvo una MIC de 1 µg/ml, para el 23% se obtuvo una MIC de 0,5 µg/ml, para el 10% se obtuvo una MIC de 0,25 µg/ml, para el 3% una MIC menor a 0,25 µg/ml, para un 16% MIC de 2 µg/ml y para el restante, una MIC superior a 4 µg/ml.

20 Estos resultados demuestran que las nanopartículas de la presente invención presentan un mejor valor de MIC que el antibiótico libre.

Ejemplo 7: Estudios de liberación

25 Se incubaron por un lado una muestra de 25 mg de nanopartículas preparadas según el método descrito en el ejemplo 1b y por el otro, una muestra de 25 mg de nanopartículas preparadas según el método descrito en el ejemplo 2b, en 5 ml de PBS cada una. En tiempos preestablecidos las muestras fueron centrifugadas utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore) durante 15 minutos. El antibiótico presente en el sobrenadante fue analizado por HPLC según el ejemplo 5. El PBS retirado en
30 la centrifugación fue reemplazado por PBS nuevo. En la figura 4 se expresa el porcentaje de antibiótico liberado respecto a la cantidad total de antibiótico encapsulado en la nanopartícula para cada tipo de nanopartícula en el tiempo (horas).

- 22 -

Las nanopartículas lipídicas presentan una gran superficie específica dado a su tamaño. Cuando se ponen en contacto con el PBS, primeramente se libera el fármaco asociado a la superficie o muy cercano a la superficie de nanopartícula. A esta primera fase de liberación rápida se le denomina "burst". En una segunda fase, el principio activo se libera por degradación/erosión o hinchamiento de núcleo de la partícula, dando lugar a la fase de liberación sostenida. En el caso de la terapia antimicrobiana, los niveles de antibiótico han resultado ser óptimos para inhibir el crecimiento *in vitro* de las bacterias *P. aeruginosa*.

10 *Ejemplo 8: Ensayos in vivo de toxicidad y distribución en ratones CD1 de las nanopartículas fabricadas según el ejemplo 1b y 2b*

Para llevar a cabo los ensayos *in vivo* de toxicidad y eficacia de las nanopartículas de la presente invención fue necesario establecer un modelo de infección de los roedores. Se llevó a cabo una administración intratraqueal de diferentes concentraciones de *P. aeruginosa* productora de mucosa dispuesta en microesferas. (Concentración 1: 5×10^4 CFU, Concentración 2: $2,4 \times 10^7$ CFU y Concentración 3: $3,89 \times 10^{10}$) obtenida de un paciente con fibrosis quística, suspendida en PBS, en ratones CD1, administrando una concentración distinta a cada roedor, para establecer la concentración óptima para generar una adecuada infección pulmonar, capaz de enfermar a los roedores sin provocar su muerte inmediata. Se concluyó que la concentración óptima era de $2,4 \times 10^7$ CFU ya que se consigue la supervivencia de los ratones más de tres días, y se comprueba tras su sacrificio que presentan una infección pulmonar.

25 Se llevó a cabo un estudio de toxicidad de las nanopartículas fabricadas según el ejemplo 1b y el ejemplo 2b, administradas por vía intratraqueal. Se administraron 1,2 mg de nanopartículas en 50 microlitros de PBS (cantidad óptima para evitar una excesiva densidad de la mezcla) a un grupo de 16 ratones CD1, además de establecerse los correspondientes grupos de control (5 ratones) a los que no se les administró producto alguno. Hasta tres días después de la administración, todos los ratones presentaron un comportamiento estándar, respondiendo a estímulos y moviéndose con normalidad. Transcurridos esos tres días, se sacrificaron los ratones y se realizó tanto un lavado broncoalveolar como la obtención y preparación de muestras del pulmón para su análisis para su estudio anatomo-patológico. El

30

35

- 23 -

estudio de las muestras no reveló inflamación o daños en los tejidos estudiados que puedan haber sido causados por las nanopartículas de la presente invención.

Adicionalmente, se administraron microesferas de 6 μm en 50 μl (equivalentes a las que se emplean para inducir la infección) cargadas con un reactivo fluorescente o fluoróforo (onda de excitación : 630-660 nm y onda de emisión 670-720 nm, de cara a poder garantizar que la técnica de administración era efectiva y que efectivamente se depositan mayoritariamente en el pulmón. En la figura 5, se presenta una imagen de los pulmones de un ratón CD1 después de la administración intratraqueal de 1×10^6 microesferas fluorescentes. El animal se sacrificó 5 minutos después de la administración de las microesferas. Las microesferas (AlignFlow™ polystyrene microspheres 6.0 μm de diámetro, λ_{ex} : 630-660 nm, λ_{em} : 670-720 nm, Invitrogen) se administraron resuspendidas en 50 μL de PBS. La localización se realizó con un sistema de registro Pearl-Impulse (LI-COR Biosciences, USA). En la imagen se observa la distribución homogénea del reactivo fluorescente 2 en la totalidad del pulmón 1 del roedor.

Ejemplo 9: Ensayos in vivo de eficacia en ratones CD1 de las nanopartículas fabricadas según el ejemplo 1b y 2b

Se emplearon cinco ratones como grupo de control y 64 ratones infectados con la inoculación de las bacterias de una cepa de *P. aeruginosa* productora de mucosa, a una concentración de $2,4 \times 10^7$ CFU, tal y como se explica en el ejemplo 8. Los animales infectados se dividieron en 4 grupos de ocho, administrándoles al tercer día tras la inoculación, vía intratraqueal, medio (PBS), el antibiótico (colistimetato sódico) libre, nanopartículas fabricadas según el ejemplo 3 y la cantidad de antibiótico equivalente en forma de nanopartículas fabricadas según el ejemplo 1b y ejemplo 2b respectivamente. Las cantidades se calcularon ajustando la dosis recomendada en humanos en relación al peso de los ratones (3000 UI, equivalente a 0,24 mg de colistimetato sódico libre, equivalente a 2,88 mg de las nanopartículas según el ejemplo 1b y 2,52 mg de nanopartículas según el ejemplo 2b).

El tratamiento se prolongó por tres días administrándose una vez al día para evitar un daño excesivo a los ratones por la sucesiva administración de anestesia y administración intratraqueal. Una vez transcurrido este tiempo los animales se sacrificaron, se extrajeron los pulmones, se homogeneizaron y se procedió a realizar

- 24 -

un cultivo en agar para poder llevar a cabo un recuento de bacterias de *P. aeruginosa*. De los resultados obtenidos, se concluyó un mayor efecto bactericida de las nanopartículas de la presente invención, al obtenerse un recuento significativamente menor que el correspondiente al colistimetato libre. En la

5 siguiente tabla se detallan los resultados obtenidos para cada caso:

Grupo	Recuento bacteriano (log CFU por cada 2 pulmones)
Sólo medio	6,7±0,3
Nanopartículas vacías	6,8±0,2
Colistimetato sódico libre	4,9 ±0,2
Nanopartículas según el ejemplo 1b	4,2±0,2
Nanopartículas según el ejemplo 2b	3,8±03

Ejemplo 10: Ensayos para la determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) de las nanopartículas fabricadas según los ejemplos 1b y 2b en células humanas

10

El valor de la concentración inhibitoria 50 (IC50) hace referencia a la concentración necesaria de la muestra a ensayar para la inhibición del crecimiento de una población celular. En este caso el valor IC50 ha sido considerado como un indicador de toxicidad, ya que el ensayo ha sido realizado sobre células humanas (en las

15 líneas celulares A549 y H441, dos líneas inmortalizadas derivadas de células epiteliales de adenocarcinomas humanas. Las células (a una densidad de 12000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos) fueron cultivadas en un medio "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) al que se le añadieron 10% de suero

20 bovino fetal, 1% de L-Glutamina, 1% de una solución de penicilina/estreptomicina y 1% un complemento de aminoácidos no esenciales (MEM-NEAA), a 37°C y a 5% de CO2 durante 24 horas. Se añadieron concentraciones decrecientes de nanopartículas 1b y 2b y colistimetato sódico libre diluidas en DMEM, con 0.5% de suero bovino fetal, empezando en 10 mg/ml y alcanzando 0.07812 mg/ml

25 incubándose posteriormente a 37°±2°C y 5% de CO2 durante 24 horas. La viabilidad

- 25 -

celular se determinó mediante el "Cell Counting kit 8", CCK-8, tras una etapa de lavado. Para ello, se añadió un 10% del reactivo CCK-8 a cada pocillo y se incubaron con las células durante 4 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 . Posteriormente se leyó la absorbancia a 450nm empleado la lectura de 650nm como referencia. La absorbancia era directamente proporcional al número de células vivas en la muestra. Los resultados se expresan como la concentración capaz de inhibir el crecimiento del 50% de las células. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados mostraron que la nanoencapsulación del antibiótico dio lugar a una disminución del valor IC50, por lo que es una formulación menos tóxica. Asimismo, esto valores están por encima del 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ reconocidos como MIC. En la siguiente tabla se detallan los resultados obtenidos para cada caso:

	Línea celular H441	Línea celular A549
Ejemplo 1b	358,49 \pm 73,86 $\mu\text{g/ml}$	1309,97 \pm 318,69 $\mu\text{g/ml}$
Ejemplo 2b	1087,14 \pm 197,43 $\mu\text{g/ml}$	2821,57 \pm 877,09 $\mu\text{g/ml}$
Colistimetato sódico libre	6,58 \pm 0,72 $\mu\text{g/ml}$	101,27 \pm 14,44 $\mu\text{g/ml}$

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula lipídica que comprende:
 - al menos un antibiótico de la familia de las polimixinas,
 - 5 - una fracción lipídica que comprende uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en monoglicéridos y/o diglicéridos y/o triglicéridos, y/o ácidos grasos y/o mezclas de los mismos, y
 - uno o más tensioactivos.
- 10 2. Nanopartícula lipídica según la reivindicación 1, en donde la fracción lipídica comprende uno o más lípidos sólidos a temperatura ambiente.
3. Nanopartícula lipídica según la reivindicación 1, en donde la fracción lipídica comprende mezclas de uno o más lípidos sólidos a temperatura ambiente y uno o
15 más lípidos líquidos a temperatura ambiente.
4. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación en peso del antibiótico con respecto a la fracción lipídica está comprendida entre, aproximadamente, 0.25:10 y, aproximadamente, 4:10 siendo
20 preferentemente de aproximadamente 1:10.
5. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la relación en peso de lípido líquido con respecto al lípido sólido está comprendida entre, aproximadamente, 0.5:10 y, aproximadamente, 5:10 siendo preferentemente,
25 1:10.
6. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proporción en peso de tensioactivo respecto al peso total de la nanopartícula está comprendida entre, aproximadamente, 0,5% y,
30 aproximadamente, 2%, siendo preferentemente, aproximadamente, al 1%.
7. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los tensioactivos son no iónicos.
- 35 8. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en

- 27 -

donde el antibiótico de la familia de las polimixinas se selecciona entre la colistina y el colistimetato sódico.

9. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
5 que comprende un crioprotector.
10. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
que está liofilizada.
- 10 11. Composición farmacéutica que comprende la nanopartícula lipídica según
cualquiera de las reivindicaciones anteriores junto con uno o más excipientes o
portadores farmacéuticamente aceptables.
12. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
15 para su uso como medicamento.
13. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones en el árbol respiratorio.
- 20 14. Nanopartícula lipídica para uso según la reivindicación 13, donde las
infecciones en el árbol respiratorio son causadas por *Pseudomona aeruginosa* y/o
microorganismos sensibles a las polimixinas.
15. Nanopartícula lipídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores la
25 cual se administra mediante inhalación en el tracto respiratorio, en forma de vapores
o aerosoles o polvos, en donde la partícula inhalada tiene un tamaño entre,
aproximadamente, 1 μm y, aproximadamente, 10 μm , preferentemente entre 1,5 μm
y 5 μm y más preferentemente entre 2 μm y 4 μm .

30

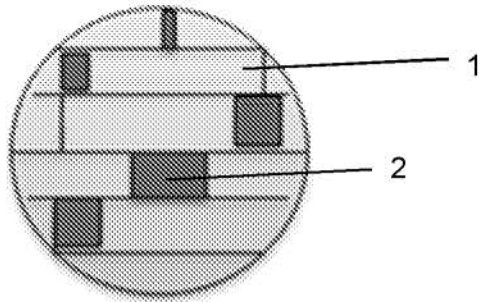


Figura 1

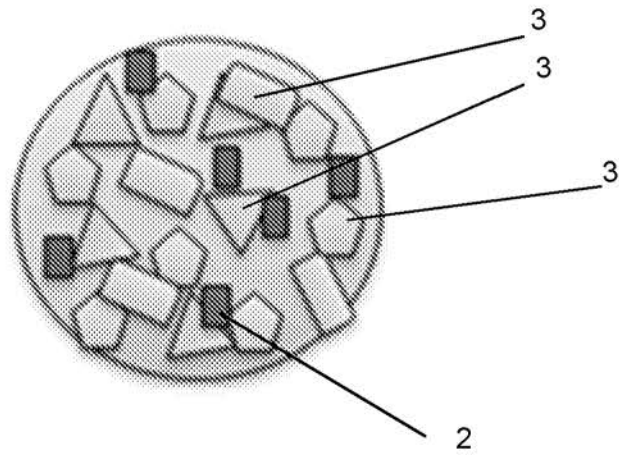


Figura 2

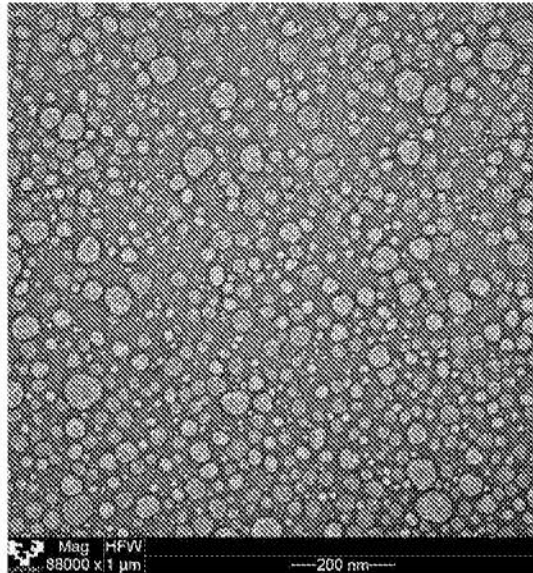


Figura 3

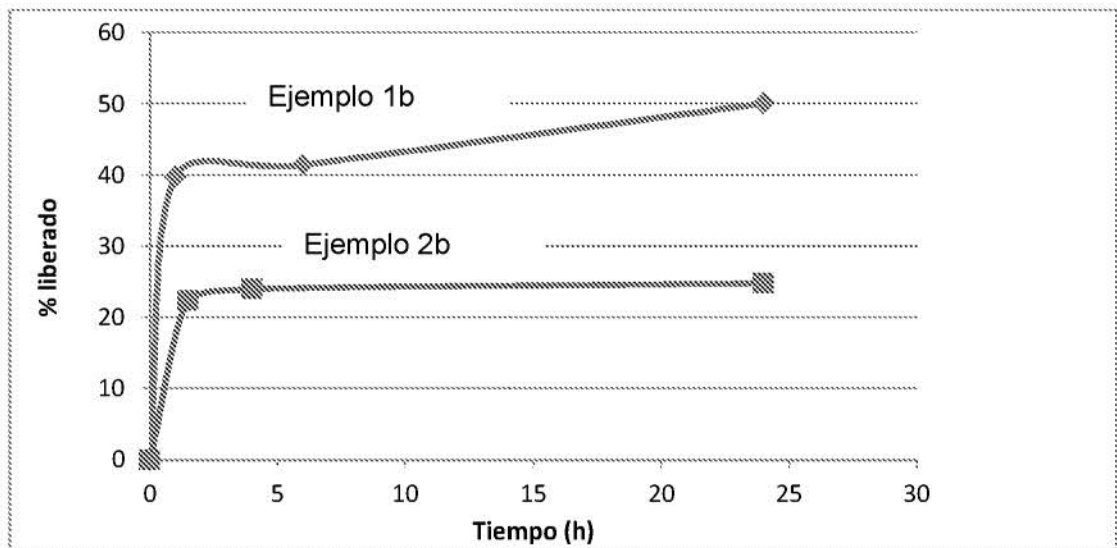


Figura 4

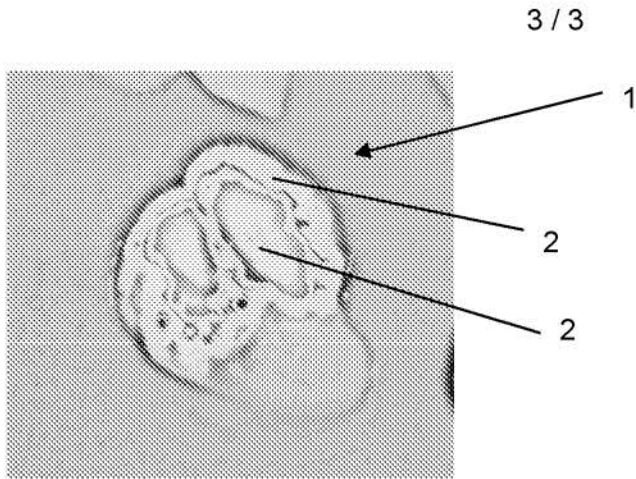


Figura 5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2014/070538

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/12 A61K9/51

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	PATTANI A. S. ET AL.: "Development and comparative anti-microbial evaluation of lipid nanoparticles and nanoemulsion of polymyxin B", JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, vol. 6, 2006, páginas 2986-2990, XP009175402, página 2987, columna de izquierda; figuras 1,2 -----	1-15
A	US 2009/169635 A1 (SCHWARZ JOSEPH [CA] ET AL) 2 de julio de 2009 (2009-07-02) paragraph [0018]; examples -----	1-15
A	WO 2012/061902 A1 (UNIV MONASH [AU]; MORTON DAVID [AU]; LARSON IAN [AU]; MCINTOSH MICHELL) 18 de mayo de 2012 (2012-05-18) ejemplo ----- -/--	1-15

 En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
 "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
 "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
 "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
 "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
 "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
 "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
 "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
 "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional
13 de agosto de 2014Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
25/08/2014Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016Funcionario autorizado
Giménez Miralles, J

N° de fax

N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2014/070538

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	EP 1 129 705 A1 (UNIV GRONINGEN [NL]) 05 de septiembre de 2001 (2001-09-05) ejemplo -----	1-15

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2014/070538

US 2009169635	A1	02-07-2009	NINGUNA			

WO 2012061902	A1	18-05-2012	NINGUNA			

EP 1129705	A1	05-09-2001	AT	271383	T	15-08-2004
			AU	3620701	A	27-08-2001
			DE	60104399	D1	26-08-2004
			DE	60104399	T2	08-09-2005
			EP	1129705	A1	05-09-2001
			EP	1257260	A1	20-11-2002
			PT	1257260	E	31-12-2004
			US	2003053960	A1	20-03-2003
			WO	0160341	A1	23-08-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2014/070538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/12 A61K9/51
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATTANI A. S. ET AL.: "Development and comparative anti-microbial evaluation of lipid nanoparticles and nanoemulsion of polymyxin B", JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, vol. 6, 2006, pages 2986-2990, XP009175402, page 2987, left-hand column; figures 1,2 -----	1-15
A	US 2009/169635 A1 (SCHWARZ JOSEPH [CA] ET AL) 2 July 2009 (2009-07-02) paragraph [0018]; examples -----	1-15
A	WO 2012/061902 A1 (UNIV MONASH [AU]; MORTON DAVID [AU]; LARSON IAN [AU]; MCINTOSH MICHELL) 18 May 2012 (2012-05-18) examples ----- -/--	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 August 2014	Date of mailing of the international search report 25/08/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Giménez Miralles, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2014/070538

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 129 705 A1 (UNIV GRONINGEN [NL]) 5 September 2001 (2001-09-05) examples -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2014/070538

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009169635	A1	02-07-2009	NONE
WO 2012061902	A1	18-05-2012	NONE
EP 1129705	A1	05-09-2001	AT 271383 T 15-08-2004
		AU 3620701 A	27-08-2001
		DE 60104399 D1	26-08-2004
		DE 60104399 T2	08-09-2005
		EP 1129705 A1	05-09-2001
		EP 1257260 A1	20-11-2002
		PT 1257260 E	31-12-2004
		US 2003053960 A1	20-03-2003
		WO 0160341 A1	23-08-2001