

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 287**

21 Número de solicitud: 201500129

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

09.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.09.2016

Fecha de concesión:

22.09.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

29.09.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/000016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (70.0%)
Secretariado de transferencia de conocimiento y
emprendimiento Pabellón de Brasil, Paseo de las
Delicias s/n
41013 Sevilla (Sevilla) ES;
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMÉDICA EN
RED (25.0%) y
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (5.0%)**

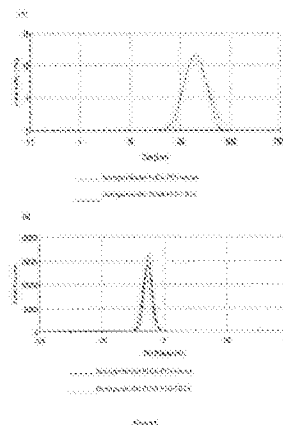
72 Inventor/es:

**MARTÍN BANDERAS, Lucía;
FERNÁNDEZ ARÉVALO, Mercedes;
BERROCOSO DOMINGUEZ, Esther y
MICÓ SEGURA, Juan Antonio**

54 Título: **Procedimiento de obtención y composición farmacéutica de nanopartículas poliméricas para el tratamiento de dolor neuropático producido por compresión nerviosa periférica**

57 Resumen:

El objeto de la presente invención es el procedimiento de obtención de una composición farmacéutica de nanopartículas poliméricas para el tratamiento del dolor neuropático producido por compresión nerviosa periférica, relacionada con la industria farmacéutica y la nanotecnología, y en particular hace referencia a un nuevo sistema de administración oral del fármaco cannabinoide CB13 basada en nanopartículas poliméricas capaces de aliviar el dolor durante nueve días tras una única administración oral de una suspensión acuosa de nanopartículas.



ES 2 582 287 B1

DESCRIPCIÓN

5 Procedimiento de obtención de una composición farmacéutica de nanopartículas poliméricas para el tratamiento del dolor neuropático producido por compresión nerviosa periférica.

Objeto de la invención

10 El objeto de la presente invención ofrece un nuevo sistema de administración oral del fármaco cannabinoide CB13 basado en nanopartículas poliméricas capaces de aliviar el dolor neuropático por compresión nerviosa periférica en ratas durante nueve días tras una única administración oral de una suspensión acuosa de nanopartículas.

15 Este modelo de dolor neuropático puede ser equivalente, con las reservas propias de la traslación de un modelo preclínico a la enfermedad en humanos, a un modelo de dolor neuropático postraumático, postquirúrgico o por atrapamiento nervioso. En general, este modelo es reconocido como un modelo de dolor neuropático de tipo mecánico, para distinguirlo de un modelo que represente un dolor neuropático periférico de tipo metabólico, tóxico (químico o viral) o el producido por enfermedades neurodegenerativas.

20 El tratamiento farmacológico actual para el dolor crónico no resulta eficaz en numerosas situaciones clínicas. Concretamente, el dolor neuropático por compresión nerviosa periférica es una de las necesidades no cubiertas en el manejo del dolor crónico.

25 Fármacos cannabinoides de reciente descubrimiento han demostrado ser útiles para el tratamiento de algunos tipos de dolor neuropático. Sin embargo, debido a su elevada lipofilia y baja disponibilidad oral se hace necesario el diseño de nuevos sistemas de administración para su administración oral, la vía más aceptada fisiológicamente para administración de un fármaco.

30 La presente invención se relaciona con la industria farmacéutica y la nanotecnología y en particular hace referencia a un nuevo sistema de administración oral de cannabinoides para el tratamiento del dolor neuropático producido por compresión nerviosa periférica.

35 La composición final combina el fármaco cannabinoide CB13, el diseño de una nanopartícula basada en el copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA), material activo en la superficie de la partícula así como un crioprotector.

40 El sistema, administrado en una única dosis oral, permite tratar de forma efectiva el dolor neuropático producido por compresión nerviosa periférica durante nueve días en ratas.

Dolor neuropático

45 El dolor neuropático es definido como el dolor "que surge como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial" (Haanpää y cols., 2010).

El dolor neuropático puede ser el resultado tanto de una lesión que afecta el sistema nervioso periférico como el central.

50 Actualmente, el dolor neuropático se define como "el dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso".

En la concepción actual, la expresión "sistema nervioso" se sustituye por "sistema somatosensorial" para distinguir el dolor neuropático del dolor causado por lesiones en otras partes del sistema nervioso, por ejemplo, dolor asociado con la espasticidad muscular en la esclerosis múltiple.

5

La denominación de Dolor Neuropático incluye cualquier tipo de lesión o disfunción primaria que afecte tanto al sistema nervioso periférico como central o al sistema simpático. De este modo, el Dolor Neuropático se puede clasificar en 3 grandes categorías:

10

a) Dolor Neuropático Periférico: las alteraciones se originan en el Sistema Nervioso Periférico, como el dolor neuropático producido por compresión nerviosa periférica (el objeto de esta invención).

15

b) Dolor Neuropático Central, en el que la lesión o disfunción primaria se localiza en el Sistema Nervioso Central.

c) Dolor Simpático: cuyo origen está en la alteración del Sistema Nervioso Simpático.

20

Estado de la técnica

Tratamiento del dolor neuropático

25

En el tratamiento rutinario en clínica del dolor neuropático es frecuente el uso de asociaciones medicamentosas, siendo los tratamientos farmacológicos utilizados los siguientes*/**:

30

(*) Algunos de ellos no tienen indicación según Ficha Técnica. (**) Se indican los utilizados en dolor neuropático periférico, el más común)

- Antidepresivos tricíclicos:

- Amitriptilina*: indicado (solo) para dolor crónico.

35

- Nortriptilina*: sin indicación para el tratamiento del dolor neuropático.

- Otros antidepresivos:

40

- Duloxetina**: sólo indicado para tratamiento del dolor neuropático periférico diabético en adultos.

- Venlafaxina*: sin indicación para el tratamiento del dolor neuropático.

45

- Desvenlafaxina*: sin indicación para el tratamiento del dolor neuropático.

- Anticonvulsivantes:

- Gabapentina**: indicada para tratamiento del dolor neuropático periférico en adultos.

50

- Pregabalina**: indicada para tratamiento del dolor neuropático periférico y central en adultos.

• Tratamientos tópicos:

5 - Crema de capsaicina al 0.075%**: indicada para alivio del dolor moderado a severo en la neuropatía diabética dolorosa que interfiera en las actividades diarias y que no haya respondido a otro tratamiento.

- Parche de lidocaína al 5%**: indicado para el alivio sintomático del dolor neuropático asociado a infección previa por herpes zoster (neuralgia postherpética).

10 - Parche de capsaicina al 8%**: indicado para tratamiento del dolor neuropático periférico en adultos no diabéticos.

• Opioides (fármacos utilizados como última elección y normalmente asociados a cualquiera de los fármacos anteriores):

15

- Tramadol, oxicodona, morfina, fentanilo, tapentadol y buprenorfina.

Los cannabinoides en el tratamiento del dolor neuropático

20 Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en la resina secretada a partir de hojas y brotes florecidos de la planta *Cannabis sativa*. La planta contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes de los que unos 60 se consideran dentro del grupo de los cannabinoides (Nocerino *et al.*, 2000).

25 El Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) es el compuesto más abundante y el principal responsable de las propiedades psicoactivas. La administración de compuestos cannabinoides se asocia además a la aparición de los siguientes efectos: analgésicos, antieméticos, acciones sobre la actividad muscular, efectos cardiovasculares, neuroendocrinos, inmunomoduladores y antiproliferativos, entre otros. Gracias al gran espectro terapéutico que presentan, tanto las autoridades como la comunidad científica consideran los cannabinoides como un potente grupo terapéutico que debe ser explorado.

30

35 Entre los efectos farmacológicos producidos por los cannabinoides, la antinocicepción constituye una de las aplicaciones terapéuticas más destacables. La administración de estos compuestos podría dar respuesta a una importante necesidad médica no satisfecha, como son algunos síndromes de dolor crónico que no responden a la terapia actual basada en antiinflamatorios y/o fármacos opiáceos. En este sentido y con objeto de disminuir los efectos psicoactivos, gracias al descubrimiento de nuevos receptores y los avances en química médica, se han sintetizado nuevos y potentes cannabinoides.

40

Los estudios se han centrado en el diseño de una nueva clase de ligandos agonistas de receptores cannabinoides, conocidos como aminoalquilindoles, los cuales han mostrado una buena actividad en receptores CB1 y CB2 en humanos. Esto ha llevado al descubrimiento de un nuevo agonista dual de CB1/CB2, 1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona (CB13, Novartis), que muestra potente actividad antihiperalgésica en modelos animales y penetración limitada en cerebro (Dziadulewicz *y cols.*, 2007).

45

50 En estudios de comportamiento de dolor crónico (neuropático y nociceptivo), el CB13 revierte la hiperalgia mecánica establecida después de la administración tanto oral como por inyección local en la pata posterior en modelos animales (cerdo y rata). En las

pruebas de comportamiento sobre la actividad del sistema nervioso central en rata, el CB13 produce efectos significativos sólo a dosis 20 veces superior que la dosis oral requerida para revertir la hiperalgesia. Por lo tanto, estos datos indican que el CB13 produce actividad antihiperalgésica predominantemente a través de una acción sobre los nervios sensoriales periféricos (Gardin y cols., 2009).

La administración de estos fármacos y más concretamente la administración oral supone un importante reto en la actualidad. Esto se debe fundamentalmente a: naturaleza altamente lipofílica, marcado efecto de primer paso, inestabilidad fisicoquímica y diversos efectos secundarios.

El CB13 pertenece a los componentes de clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad) del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), mostrando una solubilidad acuosa muy baja (~0.001-0.002 mg/mL). Como consecuencia de su pobre solubilidad y disolución en fluidos gastrointestinales, el CB13 es absorbido de forma incompleta tras una administración oral (Gardin y cols., 2009).

Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación prolongada de fármacos

En los últimos años la nanotecnología ha tenido una evolución sin precedentes llegando a un estado de singularidad, donde no se puede prever ni evitar su creciente progreso. Este incremento se ha observado en numerosas áreas, jugando un papel destacable en el área de la medicina, ofreciendo importantes avances en: tratamiento de enfermedades, técnicas analíticas y de diagnóstico, medicina regenerativa

La nanotecnología farmacéutica, y más concretamente las nanopartículas poliméricas, ofrecen en la actualidad numerosas ventajas sobre los sistemas "tradicionales" de administración de fármacos. La principal razón se debe a la relación superficie 1masa que presentan, siendo mucho mayor en comparación con otros sistemas. Esto se traduce en una mayor capacidad de transportar moléculas terapéuticas.

La liberación prolongada de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas biodegradables y biocompatibles está desarrollando un fuerte impacto en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas con implicaciones económicas muy importantes. Para el año 2017, se estimaba que el mercado mundial de liberación de fármacos facturará 200 billones € (<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/drug-delivery-technologies-market-1085.html>). Actualmente, alrededor del 75% de nuevos medicamentos aprobados por la FDA son de formulaciones mejoradas de fármacos conocidos (Bossart y cols., 2014)

Para que un sistema de administración oral basado en nanopartículas tenga éxito han de cumplir unos requisitos básicos como son : presentar baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y vida media larga (Boisseau y cols., 2005).

Existen numerosos tipos de sistemas de liberación de fármacos, entre los que destacan: micelas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas, nanotubos y conjugados poliméricos. Éstos se diferencian en su composición y estructura, pero todos tienen en común los mismos objetivos.

Entre los sistemas de liberación prolongada de activos se destaca el uso de nanopartículas poliméricas las cuales pueden permanecer en el organismo durante un

tiempo prolongado asegurando la correcta liberación del fármaco. Entre los polímeros más destacados podemos encontrar el co-polímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) por su elevada biocompatibilidad, baja toxicidad y elevado control de la liberación del fármaco. Otros polímeros de interés son: gelatinas, dextranos, quitosanos, lípidos, fosfolípidos, policianoacrilatos; poliésteres; poli(E-caprolactone) (PCL) (Hudson y Margaritis, 2014; Lai y *co/s.*, 2014; Lam y Gambari, 2014).

Sin embargo, estos polímeros presentan ciertas desventajas que los hacen menos atractivos para diseñar un sistema oral de liberación prolongada. La composición de gelatinas y quitosanos puede presentar cierto grado de heterogeneidad lo que puede dar lugar a variabilidad durante la síntesis de las partículas. Por otro lado, el proceso químico de formación de la partícula puede dar lugar a cierto grado de inmgenicidad a la partícula (Wacker, 2014).

Los poliésteres, aunque han sido ampliamente empleados en el control de la liberación de fármacos, se utilizan fundamentalmente en cosmética.

Los polialkilcianoacrilatos (PAGAs) han sido aprobados por la FDA (ethyl, n-butyl y octyl cyanoacrylate) para una administración parenteral. En 2005 la FDA aprobó una formulación de nanopartículas de doxorubicina y polyiso-hexyl-cyanoacrylate para el tratamiento del hepatocarcinoma primario, llevándose a cabo ensayos clínicos en Fase III (Transdrug®, BioAlliance Pharma, Francia).

Con la correcta selección del polímero y un diseño apropiado, estos sistemas pueden: disminuir efectos adversos; controlar la liberación del fármaco; prolongar en el tiempo su efecto terapéutico; reducir número de dosis al día; reducir costes en el tratamiento; reducir la toxicidad; presentar mayor especificidad frente a tejidos diana.

Para ello se han de controlar muy cuidadosamente aspectos básicos como tamaño y distribución de tamaños o propiedades superficiales. En este sentido, la modificación superficial y/o funcionalización con moléculas de polímeros como polietilenglicol (PEG, PEGilación) o co-polímeros como los poloxamers ha demostrado ser útil. En particular, la PEGilación resulta ser especialmente interesante tras una administración parenteral ya que se ha demostrado que evita la opsonización de las nanopartículas por parte del sistema retículo endotelial, prolongando así el tiempo de residencia en el torrente sanguíneo (Owens y Peppas, 2006). Tras la administración oral de estos sistemas PEGilados, se ha comprobado que se obtiene una mayor estabilidad ya que se reduce la degradación por parte de enzimas digestivas así como del pH (Vila y *cols.*, 2002; Jain y *cols.* 2010).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la presente invención consiste en nanopartículas de polietilenglicol (PEG) y del copolímero biodegradable y biocompatible de ácido láctico y glicólico (PLGA) unidos covalentemente y el fármaco CB13 para generar un nuevo sistema farmacéutico de administración oral que permite la remisión del dolor neuropático por compresión nerviosa periférica durante días tras una única dosis.

En la actualidad existen comercializados cuatro medicamentos basados en cannabinoides para el tratamiento de diferentes patologías:

- Sativex® (tetrahidrocannabinol + cannabidiol), espray sublingual para el tratamiento de la espasticidad en esclerosis múltiple.

- Cesamet® (nabilone, derivado sintético).
- Marinol® (dronabinol, derivado sintético) como antiemético en quimioterapia.
- Namisol® en Fase Clínica II para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tratamiento del dolor y esclerosis múltiple.

5

10 El documento *International Journal of Nanomedicine* 2012;7 5793-5806 de Martín-Banderas y *co/s.*, describe la síntesis de nanopartículas biocompatibles y biodegradables de PLGA y CB13 para una posible administración oral. Las partículas de PLGA con un tamaño homogéneo de 90-300 nm no presentaron citotoxicidad. En este documento no se describe el uso particular de PLGA-PEG con CB13 ni su efectividad *in vivo*.

15 El documento *Mol. Pharm.* 2013, 10, 4546-4551 de Shen y *co/s.* Describe el empleo de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina administradas vía oral a ratones tolerantes a opiáceos. Las nanopartículas de PLGA, PEGiladas o parcialmente PEGiladas presentaron diámetros en el intervalo 155-166 nm y fueron obtenidas mediante un nuevo procedimiento de mezclado múltiple (MIVM). El grado de antinocicepción fue evaluado mediante los test de platina caliente y prueba de la retirada de la cola (tail-flick test) encontrándose que las nanopartículas de PLGA sin pegar ofrecieron un mayor nivel restauración de la antinocicepción para morfina. Los autores no describen la duración del efecto tras la administración oral.

20

25 El documento *Drug Dev.Ind.Pharm.*, 2013, 39, 6, 854-864 de Lalani y *co/s.*, describe el empleo de nanopartículas de cargadas con tramadol PLGA y modificadas superficialmente con transferrina o lactoferrina con objeto de atravesar la barrera hematoencefálica. Las nanopartículas fueron obtenidas mediante nanoprecipitación y presentaron diámetros inferiores a 150 nm. Aquellas nanopartículas modificadas con lactoferrina presentaron un efecto antinociceptivo mayor que para aquellas modificadas con transferrina o aquellas no modificadas. Los autores no describen el empleo de PEG.

30

35 El documento *Neuromodulation*. 2012; 15(6):520-6 de Milligan y *co/s.*, describe el empleo de micropartículas de PLGA cargadas con pDNA IL-10 gen en un modelo animal de dolor neuropático. Las partículas son administradas vía intratecal. De esta forma, las partículas son rápidamente fagocitadas favoreciendo la transfección génica y la expresión del gen para IL-10 durante 8 semanas.

40 El documento *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 72(1):54-61 de Ratajczak-Enselme M y *co/s.*, describe el empleo de micropartículas de PLGA cargadas con el anestésico ropivacaina para su administración epidural (local) en el tratamiento el dolor postoperatorio en un modelo animal de oveja. La concentración de ropivacaina en el CSF tras la administración epidural fue sostenida en el tiempo, su absorción sistémica fue menor reduciéndose la toxicidad favoreciéndose su entrada en las meninges.

45

50 El documento *Spine* 2008; 33(3), 227-234, de Zanella y *co/s.*, describe el empleo de una formulación basada en PLGA para la administración del factor de tumor de necrosis alfa (TNF α) el cual induce alodinia e hiperalgesia mecánica. La formulación polimérica consiste en cilindros de 1 cm de longitud los cuales fueron administrados localmente (ipsilateral o contralateral) en un modelo animal de dolor crónico por constricción del nervio ciático (CCI). La alodinia mecánica fue evaluada mediante el test de van Frey y se

empleó el test de Hargreaves para la hiperalgesia térmica. La formulación diseñada, en forma de depósito polimérico, proporcionó analgesia durante un periodo de 59 días.

5 El documento *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14, 4, R179 de Gorth y *cols.*, evalúa *in vitro* el potencial terapéutico de microesferas de PLGA cargadas con receptor antagonista de interleukina-1 (IL-1ra) para la atenuación sostenida de la degradación del nucleus pulposus (NP) mediada por IL- β , paso clave en los procesos inflamatorios derivados de una degeneración de los discos intervertebrales que generan dolor de espalda.

10 El documento *Cannabinoids delivery systems based on supramolecular inclusion complexes and polymeric nanocapsules for treatment of neuropathic pain* (Astruc-Diaz, 2012) describe el diseño de cuatro tipos de sistemas de liberación para el fármaco cannabinoide CB2 agonista MDA7. Concretamente: (i) soluciones micelares; (ii) sistemas autoemulsificantes; (iii) liposomas de colina y (iii) complejos de inclusión en ciclodextrinas
15 para administración parenteral.

Los autores han realizado estudios *in vivo* pK/pD y han comparado la efectividad de los sistemas diseñados en un modelo de rata de dolor neuropático. Aquellos sistemas de liberación basados en ciclodextrinas fueron los más prometedores.

20 Además, en el documento se describe el diseño de nanopartículas catiónicas obtenidas por nanoprecipitación empleando los polímeros Eudragit® RS1 00/RL 100. En este último caso utilizan otro agonista CB2, el beta-caryophyllene [(E)-BCP] como fármaco modelo.

25 En ningún caso, los fármaco cannabinoides empleados, MDA7 y (E)-BCP, han sido vehiculizados en nanopartículas de PLGA.

El documento *Journal of Research in Medical Sciences* (2012) de Abrishamkar y *cols.* Muestra los resultados de un ensayo clínico randomizado en 38 pacientes donde se
30 administra de forma local (en las proximidades de la raíz y saco tecal) bupivacaina conjugada a N-methyl-2pyrrolidone-ethyl Heptanoata-(PLGA) para el alivio del dolor radicular and lumbar tras una disectomía lumbar. El ensayo mostró la capacidad de este sistema para aliviar el dolor durante las 4 siguientes semanas tras la intervención quirúrgica. En ningún caso, el fármaco fue vehiculizado en nanopartículas de PLGA.

35 El documento *J Biomater Appl.* (2013) de Chen y *cols.* Describe la obtención mediante nanoprecipitación de nanopartículas de loperamida y el copolímero poli(lactico-co-glicolico)-poli(etileno glicol)-poli(lactico-co-glicolico) (PLGA-PEG-PLGA) recubiertas con el tensioactivo poloxamer 188 o polisorbato 80 con objeto de atravesar la barrera
40 hematoencefálica y obtener un efecto antinociceptivo. La loperamida no atraviesa por sí misma la barrera hematoencefálica. Con este estudio se mostró la capacidad de estas nanopartículas de atravesarla obteniéndose un efecto máximo analgésico del 21-35% tras 150 min después de la administración intravenosa. En ningún caso, el documento describe la administración de partículas de PLGA pegiladas para administración oral.

45 El documento *J Nanopart Res* (2011) de García y *cols.* Describe una formulación inyectable basada en nanopartículas de PLGA conteniendo el anestésico bupivacaina con objeto de obtener un efecto prolongado de analgesia en el tratamiento del dolor nociceptivo y neuropático. Las nanopartículas de 453 nm de diámetro se obtuvieron por
50 triple emulsión y fueron administradas de forma local por infiltración a ratas con constricción del nervio ciático como modelo de mononeuropatía

Los resultados del estudio mostraron que el sistema administrado de forma local basado en nanopartículas de bupivacaina fue mucho más efectivo ya que mantuvo el efecto analgésico y antialodínico de forma más prolongada que cuando se administró una solución del fármaco. En ningún caso, el documento describe la administración de partículas de PLGA pegiladas para administración oral.

El documento J Nanosci Nanotechnol. (2011) de Kim y *cols.*, describe el empleo de nano- y micropartículas de PLGA conteniendo capsaicina. Las nanopartículas fueron obtenidas por nanoprecipitación con tamaños de 152-163 nm de diámetro. Con objeto de controlar aún más la liberación y aumentar la eficacia de encapsulación del fármaco, se llevaron modificaciones en el método de obtención empleándose otros polímeros biodegradables como la policaprolactona (PCL). De esta forma se obtuvieron formulaciones de capsaicina capaces de controlar su liberación desde 1 semana hasta 1 mes. En ningún caso, el documento describe la administración de partículas de PLGA pegiladas para administración oral

El documento Nanoparticles with biodegradable and biocompatible polymer PLGA, loaded with the drug for human use pentoxifylline de Constandil Córdova (W02014075203) describe nanopartículas biocompatibles y biodegradables para la administración del fármaco pentoxifilina para el uso en el tratamiento y prevención del dolor crónico mediante una dosis única administrada. El documento se refiere tanto al método de síntesis como a su utilización y reivindica la formulación farmacéutica, con partículas de PLGA con proporción variable de ácido láctico/glicólico del 10 al 90% y viceversa, con una tamaño homogéneo entre 150 y 410 nm una carga superficial negativa ente -24 y 13 mV, una eficacia de encapsulación del 40-60%, la proporción de pentoxifilina encapsulada es de 1-3 µg en 10 µL se solución de partículas. Su administración puede ser vía intratecal, vía intravenosa o vía intramuscular. En este documento no se describe el uso particular de PLGA y/o PEG con CB13 ni a una vía de administración oral.

El documento Polymeric particles-based temozolomide dosage form de Vasilenko y *cols.* (WO2014091078A1) describe un sistema de liberación controlada del fármaco anticanceroso temozolomide (TMZ) basado en nanopartículas de PLGA. La formulación incluye un material activo, alcohol polivinílico o albúmina sérica en la superficie y un crioprotector (D-manitol o glucosa). El documento describe la obtención de las nanopartículas mediante emulsión-evaporación del disolvente con un diámetro medio de 200-500 nm. Las nanopartículas obtenidas, para administración vía oral en forma de cápsulas o comprimidos o administración diaria vía parenteral en forma de suspensión estéril, reducen la toxicidad del fármaco libre.

El documento. Microparticles and nanoparticles having negative surface charges de Bin (WO2014089160) describe la producción de nano- micropartículas de PLGA con superficie eléctrica negativa. Las partículas son elaboradas mediante el método de emulsión-evaporación del disolvente. Las partículas presentan un potencial zeta de -5 a +200 mV, preferiblemente, -35 a -85 mV y tamaños en el intervalo 10-1000 nm. Las partículas pueden ser PEGiladas por tres procedimientos: (i) absorción de PEG sobre la superficie de las partículas; (ii) mezclando PEG y PLGA durante la síntesis o (iii) unido covalentemente a PLGA. La finalidad de las partículas es el tratamiento de enfermedades inflamatorias de respuesta inmune mediante su administración oral o parenteral.

El PLGA ha sido ampliamente utilizado para el encapsulamiento de fármacos, sin embargo, no se conocen divulgaciones de una formulación oral para el tratamiento del

dolor neuropático por compresión nerviosa periférica que corresponda a una nanopartícula de PLGA-PEG que contenga fármacos cannabinoides para su administración oral.

5 Referencias bibliográficas

- Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, y cols.. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain*. 2011 ;152(1):14-27. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.031.
- 10 Abrishamkar S, Torkashvand M, borujeni AM, Borujeni AM, Rezvani M, Tabesh H, et al. Efficacy of N-Methyl-2-pyrrolidone-Ethyl heptanoate (PLGA)-bupivacaine in situ forming system on radicular and low back pain relief following lumbar discectomy: A randomized clinical trial. *Journal of Research in Medical Sciences* 2012; 17:S165-S170.
- 15 Astruc-Diaz F., Cannabinoids delivery systems based on supramolecular inclusion complexes and polymeric nanocapsules for treatment of neuropathic pain. Tesis Doctoral, Lyon (Francia), 2012.
- 20 Bin W. Microparticles and nanoparticles having negative surface charges. WO2014089160.
- Boisseau P, Kiparissides C, Pavesio A, Saxl O, Nanotechnology for Health. Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for Nanomedicine. European Technology Platform on Nanomedicine. Comisión Europea (2005).
- 25 Bossart J, Sedo K, Kararli T. Delivery Report. Drug Delivery Products & Technologies, a Decade in Review: Approved Products 2000 to 2009
- 30 Chen Y, Hsieh W, Lee W, Zeng D. Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood-brain barrier. *J Biomater Appl* 2013;27(7):909-922.
- 35 Constandil Córdova LE, Ibarra Durán PS, Vilos Ortíz CA, Velásquez Cumplido L, Pelissier Serrano T, Laurido Fuenzalida CA, Hernández Kunstmann A. Nanoparticles with biodegradable and biocompatible polymer PLGA, loaded with the drug for human use pentoxifylline WO2014075203.
- 40 Dziadulewicz EK, Bevan SJ, Brain CT, Coote PR, Culshaw AJ, y cols. Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone: A potent, orally bioavailable human CB1/CB2 dual agonist with antihyperalgesic properties and restricted central nervous system penetration. *J. Med. Chem.* 50, 3851 (2007).
- 45 Garcia X, Escribano E, Domenech J, Queralt J, Freixes J. In vitro characterization and in vivo analgesic and anti-allodynic activity of PLGA-bupivacaine nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 2011 ;13(5):2213-2223.
- 50 Gardin A., Kucher K, Kiese B, and Appei-Dingemane S. Cannabinoid receptor agonist 13, a novel cannabinoid agonist: First in human pharmacokinetics and safety. *Drug Metab. Dispos.* 37, 827 (2009).

Gorth DJ, Mauck RL, Chiaro JA, Mohanraj B, Hebel NM, Dodge GR, Elliott DM, Smith LJ. IL-1ra delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1-mediated degradation of nucleus pulposus in vitro. *Arthritis Res Ther.* 2012 3;14(4):R179. doi: 10.1186/ar3932.

5

Hudson and Margaritis A. Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. June 2014, Vol. 34, No. 2, Pages 161-179.

10

Jain K, Goyala A, Mishra N, Vaidya B, Mangal S, Vyas SP. PEG-PLA-PEG block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *International Journal of Pharmaceutics* 387 (2010) 253-262

15

Kim S, Kim JC, Sul D, Hwang SW, Lee SH, Kim YH, et al. Nanoparticle Formulation for Controlled Release of Capsaicin. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2011;11 (5):4586-4591.

20

Lai P, Daear W, Löbenberg R, Prenner EJ. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 118(1), 2014, 154-163

25

Lalani J, Rathi M, Lalan M, Misra A Protein functionalized tramadol-loaded PLGA nanoparticles: preparation, optimization, stability and pharmacodynamic studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2013;39(6):854-864.

30

Lam PL, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries *Journal of Controlled Release* 178 (2014) 25-45.

Martín-Banderas L, Josefa Álvarez-Fuentes, Matilde Durán-Lobato, José Prados, Consolación Melguizo, Mercedes Fernández-Arévalo, M^a Ángeles Holgado. Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies *International Journal of Nanomedicine* 2012;7 5793-5806

35

Milligan ED, Penzkover KR, Soderquist RG, Mahoney MJ. Spinal Interleukin-10 Therapy to Treat Peripheral Neuropathic Pain. *Neuromodulation* 2012; 15(6):520-526.

40

Nocerino E, Amato M, Izzou AA (2000), "Cannabis and cannabinoid receptor", *Fitoterapia*, 71:6-12.

45

Ratajczak-Enselme M, Estebe J, Dollo G, Chevanne F, Bec D, Malinovsky J, et al. Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetic study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009;72(1):54-61.

50

Shen H, Hu X, Szymusiak M, Wang ZJ, Liu Y. Orally Administered Nanocurcumin to Attenuate Morphine Tolerance: Comparison between Negatively Charged PLGA and Partially and Fully PEGylated Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 2013; 10(12):4546-4551.

Vasilenko E, ; Vorontsov E, ; Severin E, ; Gulenko V, Mitrokhin M, ; Iurchenko, M. Polymeric particles-based temozolomide dosage form WO2014091 078.

5 Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso MJ. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release* 78 (2002) 15-24

Wacker M. Nanocarriers for intravenous injection-The long hard road to the market. *International Journal of Pharmaceutics* Volume 457, Issue 1, 2013, Pages 50-62

10 Zanella JM, Burrig EN, Hildebrand K, Hobot C, Cox M, Christoferson L, et al. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine* 2008;33(3):227-234.

15 <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/drug-delivery-technologies-market-1085.html>, Septiembre, 2014.

Owens DE, Peppas NA Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*: 2006; 307(1), 93-102.

20 **Descripción de las figuras**

Figura 1: (A) Tamaño y distribución de tamaño de partículas de PLGA-PEG vacías y cargadas con CB13. (B) Potencial zeta de partículas cargadas con CB13 y vacías

25 Figura 2. Efecto antinociceptivo de diferentes formulaciones ensayadas tras una única administración oral nanopartículas vacías de PLGA y nanopartículas cargadas con CB13 a tres dosis distintas. (A) nanopartículas de PLGA no pegiladas. (B) Nanopartículas de PLGA-PEG (covalentemente unido) (vehículo: DMSO)

30 **Descripción de la invención**

La presente invención divulga una nueva formulación farmacéutica cuya composición final combina el fármaco cannabinoide CB13, el diseño de una nanopartícula basada en el copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA), material activo en la superficie de la partícula así como un crioprotector y su uso para el tratamiento efectivo el dolor neuropático por compresión nerviosa periférica mediante la administración de única dosis oral.

40 En una realización preferida, las nanopartículas son sintetizadas por el método de nanoprecipitación, que comprende las siguientes etapas:

- a) Disolución del polímero PEG-PLGA en un solvente
- b) Disolución de un tensioactivo lipófilo en la solución anterior
- 45 c) Disolución del fármaco en la solución anterior
- d) Disolución de un tensioactivo hidrófilo en agua purificada
- 50 e) Adición de la co-disolución fármaco-polímero (a+b+c) sobre la disolución del tensioactivo (d) gota a gota

- f) Evaporación del solvente donde se disolvió el fármaco y el polímero
- g) Lavado de las nanopartículas con agua purificada
- 5 h) Recuperación de las nanopartículas
- i) Adición de un crioprotector
- 10 j) Conservación de las nanopartículas a congelación

Las nanopartículas cargadas con CB13 de la presente invención son útiles para aliviar el dolor neuropático por compresión nerviosa periférica mediante la administración oral de una dosis única.

15 La formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención comprende la suspensión de nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 obtenidas del método antes descrito y cualquier aditivo, agente, excipiente o coadyuvante adecuado.

20 La presente invención divulga una nueva formulación farmacéutica que comprende dos polímeros biodegradables: el copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) y el polietilenglicol (PEG); el fármaco cannabinoide CB13 y el uso para el tratamiento efectivo del dolor neuropático por compresión nerviosa periférica mediante la administración oral de una única dosis.

25 Las nanopartículas de poliésteres como el PLGA son adecuadas como sistemas de liberación controlada y sostenida de fármaco debido a su perfil de liberación, su alta biocompatibilidad y a que sus productos de degradación son absorbidos. La presencia de cadenas de PEG en las nanopartículas, a su vez, confiere mayor estabilidad en
30 ambientes ácidos como en el estómago, previenen la absorción de proteínas y previenen fenómenos de opsonización por parte de los macrófagos aumentando el tiempo de circulación sistémica.

35 La presente invención utiliza el fármaco 1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona (CB13, Novartis), un nuevo agonista dual de los receptores CB1/CB2, que muestra potente actividad antihiperálgica en modelos animales y penetración limitada en cerebro. Sin embargo, el fármaco pertenece a la Clase II de la Clasificación Biofarmacéutica de Fármacos (BCS), baja solubilidad acuosa. Esto hace que para su
40 administración oral en los estudios donde se ha demostrado su actividad farmacológica, se haya recurrido al empleo de soluciones micelares empleando agentes emulsificantes y solubilizantes como Chremophor® (agente no iónico basado en aceite de castor y óxido de etileno) y/o Labrafil® M2125CS. Estos sistemas micelares administrados vía oral proporcionaron una analgesia durante 8 horas máximo en función de la dosis administrada.

45 La utilización de nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 resuelve este problema ya que permite la liberación lenta, controlada y sostenida del fármaco a medida que la partícula se degrada y/o erosiona, por lo que la administración de una única dosis oral tiene efecto aliviando el dolor crónico durante días.

50

Las nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 de la presente invención son sintetizadas por cualquier método conocido en el arte, por ejemplo, pero no limitado a emulsión simple o doble-evaporación del disolvente; método de separación del polímero o nanoprecipitación, o método de secado por atomización, tradicionales o modificados.

5 En una realización preferida, las partículas son sintetizadas mediante el método de nanoprecipitación que comprende las etapas de:

a) Disolución del polímero PEG-PLGA en un solvente;

10 b) Disolución de un tensioactivo lipófilo en la disolución anterior

c) Disolución del fármaco en la solución anterior;

15 d) Disolución de un tensioactivo en agua purificada;

e) Adición de la disolución de fármaco, polímero y fármaco (a+b+c) sobre la disolución del tensioactivo (d) gota a gota y en agitación continua;

20 f) Evaporación a temperatura ambiente del solvente donde se disolvió el fármaco y el polímero

g) Lavado de las nanopartículas con agua purificada

25 h) Colección de las nanopartículas

i) Adición de un crioprotector

j) Conservación de las nanopartículas a congelación

30 El polímero PEG-PLGA utilizado en la etapa a) y por tanto, las nanopartículas de la presente invención, tienen un rango de proporción de ácido láctico a ácido glicólico desde 10% de ácido láctico y 90% de ácido glicólico hasta 90% de ácido láctico y 10% de ácido glicólico, pudiéndose cualquier proporción que se encuentre en ese intervalo. En una realización preferida la proporción es 50% de ácido láctico y 50% de ácido glicólico.

35 El peso molecular del PEG incluido puede variar desde 2.000 a 20.000 Da. En una preparación preferida es de 2.000 Da. El PEG está unido covalentemente a PLGA.

40 El solvente empleado para disolver al polímero en la etapa a) es cualquiera que permita disolver el polímero, por ejemplo, pero no limitado a acetona o acetonitrilo.

45 La proporción de polímero:fármaco utilizada en el método de síntesis de la presente invención va desde 99:1; 95:5; 90:10; 85:15, pudiéndose cualquier combinación que se encuentre alrededor de ese intervalo. En una utilización preferida, la proporción polímero:CB13 es 90:10 y 85:15.

50 El tensioactivo empleado en la etapa b) puede ser cualquiera que sea lipófilo y permita la formación de partículas aisladas y no agregadas, por ejemplo, pero no limitado, Span® 60 y sus derivados.

En una realización preferida, cuando se utiliza Span® 60 en la etapa b), la solución del Span® 60 en el solvente de la etapa a) comprende 0.1 - 5.0 % p/v. En una realización aún más preferida la solución del Span® 60 en el solvente de la etapa a) comprende 0.5% p/v de Span® 60.

5

La etapa e) de adición de (a+b+c) sobre d) se realiza con cualquier método conocido en la técnica pudiéndose manual empleando una jeringa y agujas adecuadas o empleando un sistema que controle la velocidad de adición de una fase sobre otra. En una realización preferida, se emplea una bomba de jeringa a una velocidad, pero no limitada, de 5 mL/h utilizando una jeringa y aguja amarilla.

10

La agitación de la etapa e) se realiza pero no se limita a una agitación magnética pudiendo ser mecánica y a una velocidad, pero no limitada, de 300-1000 rpm. En una realización preferida la agitación será magnética, a temperatura ambiente, y a una velocidad de 600 rpm.

15

El tensioactivo empleado en la etapa d) puede ser cualquiera que permita reducir la tensión superficial del agua y permita la formación de partículas aisladas y no agregadas, por ejemplo, pero no limitado, Pluronic® F68 y derivados; polietilenglicol y sus derivados, alcohol polivinílico o emulsificantes catiónicos o aniónicos de uso farmacéutico o cualquier combinación de ellos.

20

En una realización preferida, cuando se utiliza Pluronic® F68 en la etapa d), la solución del Pluronic® F68 en agua purificada comprende 0.1 - 5.0 % p/v. En una realización aún más preferida la solución del Pluronic® F68 en agua purificada de la etapa d) comprende 0.5% p/v de Pluronic® F68.

25

La evaporación del solvente de la etapa a) se realiza por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, pero no limitado a: agitación de la suspensión de partículas; corrientes de gases como nitrógeno u oxígeno, calor, a vacío, liofilización o cualquier combinación de ellas. En una realización particular, la evaporación del solvente se realiza a temperatura ambiente, durante 4-5 horas, por agitación orbital.

30

La colección de las partículas en suspensión de la etapa h) se realiza por cualquier método conocido, por ejemplo, pero no limitado a: filtración; filtración y centrifugación; centrifugación diferencial; centrifugación en gradiente; o cualquier combinación entre ellas. En una realización particular, las partículas se coleccionan por centrifugación a 4-12°C, 9.000-11.000 rpm durante 45-60 minutos. En una realización aún más particular, las partículas se coleccionan por centrifugación a 4°C, 11.000 rpm durante el tiempo necesario para recoger una suspensión concentrada de nanopartículas.

35

40

El método de colección de las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención permite una recuperar entre un 60-80% del peso de las partículas. En una realización preferida, la eficacia del proceso de colección es del 70% del peso de las partículas.

45

Las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención tienen un tamaño homogéneo entre 145-450 nm de diámetro medio. En una realización preferida las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención tienen un diámetro medio de 180 nm.

50

Las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención son esféricas y tienen una carga eléctrica superficial negativa con un valor entre -35 mV hasta -20 mV. En una realización preferida las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención tienen una carga eléctrica superficial de -26 mV.

5

El método de síntesis de las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención permite una eficacia de encapsulación entre 70 y 90% del fármaco agregado. En una realización preferida, la eficacia de encapsulación es del 80% del fármaco.

10

La proporción de CB13 encapsulada en las partículas de PEG-PLGA de la presente invención es entre 9-15% p/p. En una realización preferida, la proporción de CB13 encapsulada es del 13% p/p fármaco/polímero.

15 **Ventajas de la presente invención**

La presente invención resuelve el problema de la necesidad de una administración permanente de medicamentos para tratar el dolor neuropático por compresión nerviosa periférica.

20

La presente invención utiliza una única dosis oral de una formulación farmacéutica que comprende al menos una suspensión acuosa de nanopartículas poliméricas biodegradables y biocompatibles de PLGA cargadas con el fármaco CB13 para tratar el dolor neuropático por compresión nerviosa periférica y puede comprender adicionalmente cualquier aditivo, coadyuvante o agente farmacéutico adecuado.

25

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1. Síntesis y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con CB13.

30

Las nanopartículas se elaboraron mediante el método modificado de nanoprecipitación descrito por Fessi y cols. (1989).

El tipo de PLGA-PEG (Sigma) empleado está compuesto por 50% de ácido glicólico y 50% de ácido láctico

35

El polímero se disolvió en 2 mL de acetona (1.5% w/v) junto con el tensioactivo Span®60 (0.5% w/v). Una vez disueltos, se adicionaron 7.5 mg de fármaco. A continuación, esta disolución se adicionó gota a gota a una velocidad constante de 5 mL/h mediante una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) sobre 15 mL de una solución de Pluronic® F68 (0.5% w/v) bajo agitación magnética (600 rpm, IKA) a temperatura ambiente.

40

La acetona fue evaporada mediante agitación suave durante 4 h a temperatura ambiente. Tras este proceso las nanopartículas se lavaron con agua miliQ y se recogieron mediante ultracentrifugación (4°C, 60 min, 10.000 rpm, Eppendorf). Finalmente, el pellet recogido se resuspendió en 1 mL de una solución de trealosa (VWR) al 5% p/v y se almacenó a -20°C.

45

Para controlar el proceso de producción de las nanopartículas, se prepararon partículas vacías, sin fármaco, empleando los mismos métodos anteriormente descritos.

50

El tamaño y potencial zeta de las nanopartículas se midió mediante dispersión de luz dinámica (DLS) (Zetasizer Nano Z, Malvern, Reino Unido). Para ello se tomó una alícuota de 100 uL de la suspensión de las nanopartículas y se llevó a un volumen de 1 mL de agua miliQ para su análisis mediante DLS.

5

Las nanopartículas de PLGA-PEG mostraron un tamaño de partícula de 200.54 ± 28.80 nm (n=6), y no mostraron diferencias significativas respecto a las partículas vacías, como se observa en la Figura 1A.

10

La Figura 1B muestra la carga superficial de las nanopartículas cargadas y vacías. Como se observa, prácticamente no hay diferencias en los valores, Las partículas mostraron un potencial negativo de -26.95 ± 1.94 mV (n=6)

Ejemplo 2. Eficacia de Encapsulación y Capacidad de Carga de Fármaco.

15

La eficacia de encapsulación (EE%) y carga de fármaco de las partículas (CCF) se determinó comparando de forma cuantitativa la cantidad de fármaco inicial y aquella extraída tras la ruptura de una determinada cantidad de nanopartículas (5 mg) tras su disolución en 1 mL de acetona.

20

La cantidad de fármaco se cuantificó mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) en un equipo Hitachi LaChrom® Series D-7000 (Hitachi Ud, Tokyo, Japón) equipado con inyector automático (L-7200), una interfase D-7000 una bomba cuaternaria (modelo L-7100), y un detector UV-VIS DAD (modelo L-7455). Se utilizó una columna Spherisorb ODS2 (Waters Corp) (10 μ m, 4.6 mm x 250 mm), a $40.0^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ Elite LaChrom L-2350 horno). Los datos fueron recolectados y analizados mediante el software HSM D-7000 LaChrom® software (Hitachi, Ud).

25

Para la separación cromatográfica del CB13 se utilizó una fase móvil compuesta por dos solventes:

30

- Solvente A: acetonitrilo:agua:ácido acético (75:23.7:1.3 v/v)
- Solvente B: acetonitrilo

35

Los solventes se mantuvieron en una proporción de 70%:30% (A:B) a un flujo constante de 1.00 mL/min.

La longitud de onda se fijó a 230 nm y el volumen de inyección a 10 μ L.

40

La EE% se determinó a partir de la siguiente relación:

$$\text{EE\%} = \left(\frac{\text{cantidad de CB13 actual en las nanopartículas}}{\text{cantidad de CB13 teórica en las nanopartículas}} \right) \times 100$$

45

La CC se determinó a partir de la siguiente relación:

$$\text{CC\%} = \left(\frac{\text{masa de CB13 actual en las nanopartículas}}{\text{masa de nanopartículas}} \right) \times 100$$

50

Los resultados de eficacia de encapsulación mostraron que un 80% del fármaco añadido durante el proceso de preparación de las nanopartículas fue incluido en su interior. A partir de estos resultados se calculó la capacidad de carga. Sabiendo que durante el proceso de lavado y recuperación de las partículas se pierde un 30% de masa de partículas y que se encapsula el 80% del fármaco inicialmente empleado, se procede a calcular la cantidad de partículas a emplear en los ensayos in vivo donde se fijaron 3 dosis distintas.

Ejemplo 3. Determinación de las propiedades analgésicas y comparación in vivo de las nanopartículas.

Animales

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Harlan Sprague-Dawley (230-350 g), proporcionadas por la unidad de experimentación animal de la Universidad de Cádiz registrada con el número ES110120000210. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de estabulación (21°C, ciclo de luz-oscuridad de 12 h, agua y comida "*ad libitum*"). Todos los experimentos se han realizado siguiendo las líneas éticas para el trabajo con animales de experimentación propuestas por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), por la Federación Europea de Asociaciones del Animal de Laboratorio (FELASA).

Modelos de dolor neuropático

Como modelo de mononeuropatía se ha empleado la constricción crónica del nervio ciático (chronic constriction injury, CCI) puesto que se trata de un modelo que guarda buena correlación con la sintomatología presentada en los pacientes (dolor espontáneo, alodinia e hiperalgia mecánica y térmica).

Evaluación del comportamiento nociceptivo

El comportamiento nociceptivo ha sido evaluado en la pata ipsi- y contralateral a la ligadura del nervio ciático inyección. La presencia de hiperalgia mecánica se ha evaluada usando el paw-pinch test. Así, una presión gradual creciente (empezando con 30 g de presión) fue ejercida sobre la parte dorsal de la pata usando un dispositivo motorizado (Analgesia Meter 57215, UGO 8ASILE). El *cut-off* se estableció en 250 g para prevenir el posible daño de la pata. Dos medidas fueron tomadas en cada pata, con 5 minutos de intervalo, y el valor medio fue usado para fines estadísticos. La hiperalgia mecánica se manifiesta mediante la disminución de la presión soportada en la pata.

Los grupos controles (Vehículo-DMSO y Nanopartícula) mostraron, como era de esperar, un comportamiento hiperalgésico que se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento (Fig. 1A y 1B).

El efecto antihiperalgésico del CB13 fue evidente a los 30 minutos de su administración y presentando su efecto máximo entre el minuto 30 y las 3 horas. A las 9 horas de la administración el CB13 sigue siendo efectivo pero en menor medida y a las 24 horas su eficacia había desaparecido. Con respecto a la combinación de nanopartículas sin PEGilar (Fig. 1A) con tres dosis crecientes de CB13 (1.7-6.8 mg/kg) podemos observar un efecto analgésico claramente dosis dependiente. El efecto de las nanopartículas sin PEGilar y las diferentes dosis de CB13 se evidenció a los 30 min de su administración,

sin embargo, fue de menor magnitud que el CB13 solo. Por otro lado, el efecto analgésico se mantuvo hasta las 96 horas (4 días).

5 El efecto analgésico del grupo CB13 fue muy similar al grupo experimental anterior. Con respecto a la combinación de Nanopartículas 3 PEGiladas (Fig. 1B) con las diferentes dosis de CB13 podemos observar que el efecto analgésico apareció a los 30 min tras la administración en el grupo de Nanoparticulas3+CB13 (6.8 mg/kg) y a las 3 horas en el grupo con Nanoparticulas3+CB13 (3.4 mg/kg). Este efecto analgésico de ambos grupos se mantuvo hasta los 9 días tras la administración. El grupo de Nanoparticulas3+CB13
10 (1.7 mg/kg) presentó un efecto analgésico estadísticamente significativo a las 9 y 24 horas post-administración.

REIVINDICACIONES

- 1 Procedimiento de obtención de nanopartículas del copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) y el polietilenglicol (PEG) con el fármaco cannabinoide CB13 encapsulado, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: a) Disolución del polímero PEG-PLGA en un solvente: b) Disolución de un tensioactivo lipófilo en la disolución anterior: c) Disolución del fármaco en la solución anterior: d) Disolución de un tensioactivo en agua purificada; e) Adición de la co-disolución fármaco-polímero (a+b+c) sobre la disolución del tensioactivo (d) gota a gota y en agitación magnética continua : f) Evaporación a temperatura ambiente del solvente donde se disolvió el fármaco y el polímero: g) Lavado de las nanopartículas con agua purificada; h) Colección de las nanopartículas; i) Adición de un crioprotector; j) Conservación de las nanopartículas a congelación.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polímero PEG-PLGA tienen un rango de proporción de ácido láctico a ácido glicólico desde 10% de ácido láctico y 90% de ácido glicólico hasta 90% de ácido láctico y 10% de ácido glicólico, pudiéndose cualquier proporción que se encuentre en ese intervalo.
3. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el peso molecular del PEG varía desde 2.000 a 20.000 Da.
4. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la proporción del polímero respecto al fármaco varía en el intervalo 99:1 a 85:15.
5. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el tensioactivo en la etapa (d) es un tensioactivo lipófilo.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el tensioactivo lipófilo se selecciona entre polietilenglicol y sus derivados, alcohol polivinílico y sus derivados, emulsificantes catiónicos o aniónicos de uso farmacéutico o cualquier combinación de ellos.
7. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la agitación magnética tiene lugar a una velocidad 600 rpm.
8. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la evaporación se realiza por agitación de la suspensión de partículas, corrientes de gases como nitrógeno u oxígeno, calor, a vacío, liofilización o cualquier combinación de ellas.
9. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la evaporación a temperatura ambiente por agitación mecánica a 600 rpm tiene lugar durante 4 horas.
10. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la colección de las partículas en suspensión se realiza por: filtración, filtración y centrifugación, centrifugación diferencial, centrifugación en gradiente o cualquier combinación entre ellas.

11. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las partículas se coleccionan por centrifugación a 4°C y a 10.000 rpm durante el tiempo necesario para obtener un concentrado de nanopartículas.
- 5 12. Una composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende nanopartículas de ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA) con CB13 encapsulado
- 10 13. Una composición farmacéutica según reivindicación 12, **caracterizada** porque la nanopartícula cargada con CB13 tiene una proporción de ácido láctico a ácido glicólico desde 10% de ácido láctico y 90% de ácido glicólico hasta 90% de ácido láctico y 10% de ácido glicólico, pudiéndose cualquier proporción que se encuentre en ese intervalo.
- 15 14. Una composición farmacéutica según reivindicación 12 y 13, **caracterizada** porque la nanopartícula cargada con CB13 tiene una proporción de ácido láctico del 50% y del 50% de ácido glicólico y un tamaño homogéneo entre 145-450 nm de diámetro medio.
- 20 15. Una composición farmacéutica según reivindicación 12 a 14 **caracterizada** porque las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 de la presente invención son esféricas.
- 25 16. Una composición farmacéutica según reivindicación 12 a 15 **caracterizada** porque las nanopartículas de PEG-PLGA cargadas con CB13 tienen una carga eléctrica superficial negativa con un valor entre -35 mV hasta -20 mV.
- 30 17. Una composición farmacéutica según reivindicación 12 a 16 **caracterizada** porque la proporción de CB13 encapsulada en las nanopartículas de PEG-PLGA es entre 9-15% p/p.
18. Una composición farmacéutica según reivindicación 12 a 17 **caracterizada** porque la dosis única de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con CB13 está en el intervalo de 0.1-10.0 mg de CB13 por kilogramo de peso corporal.

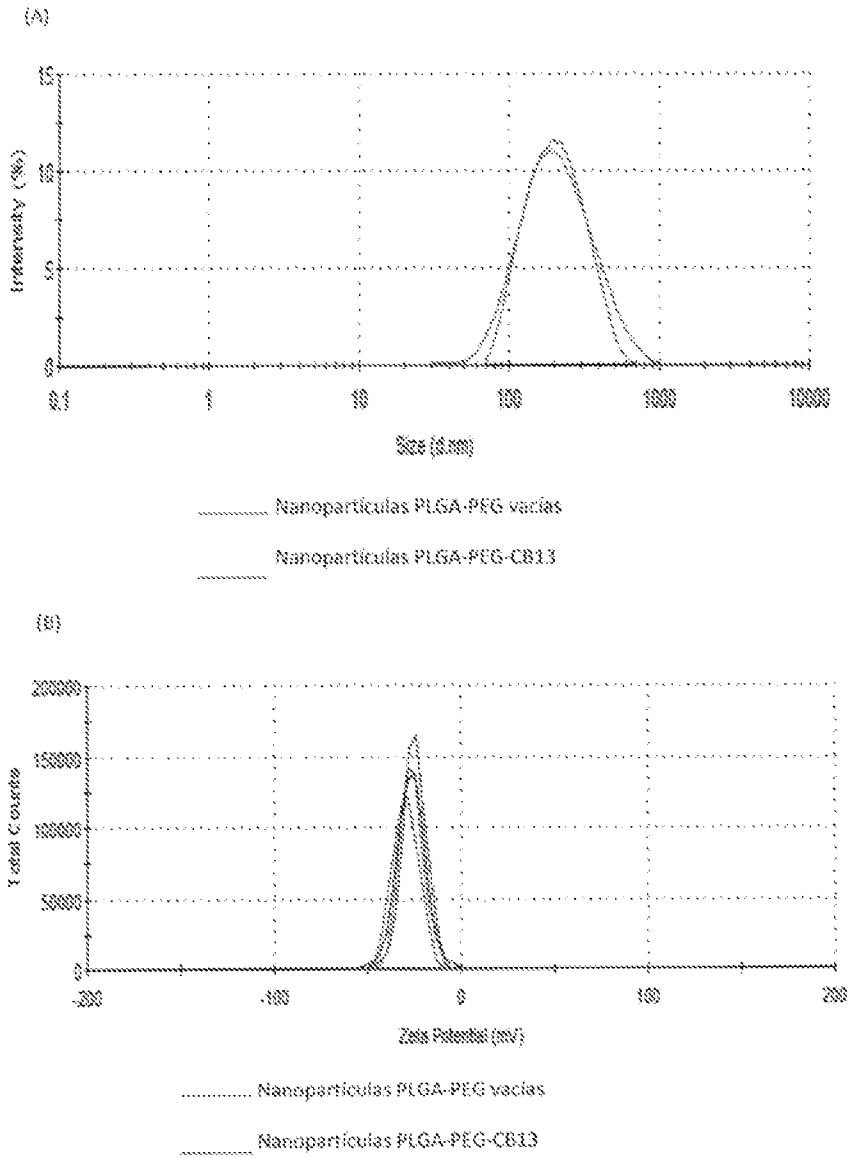
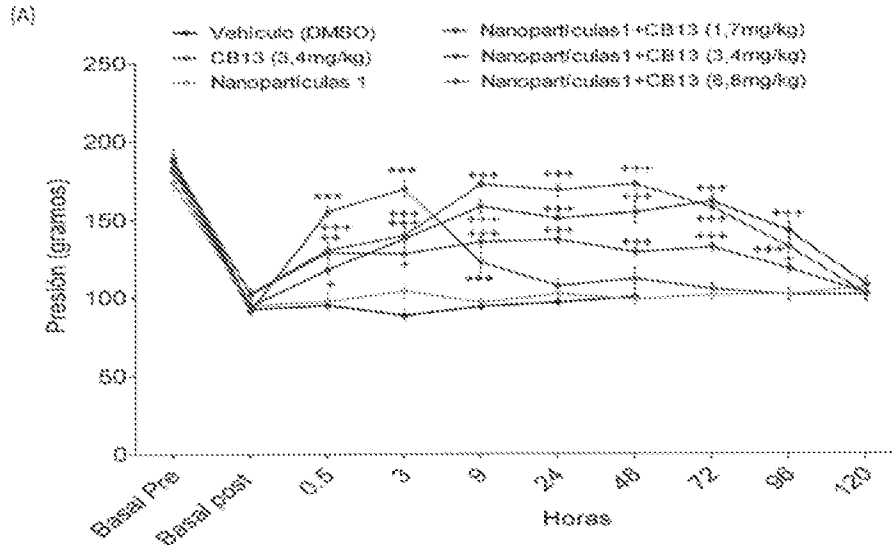
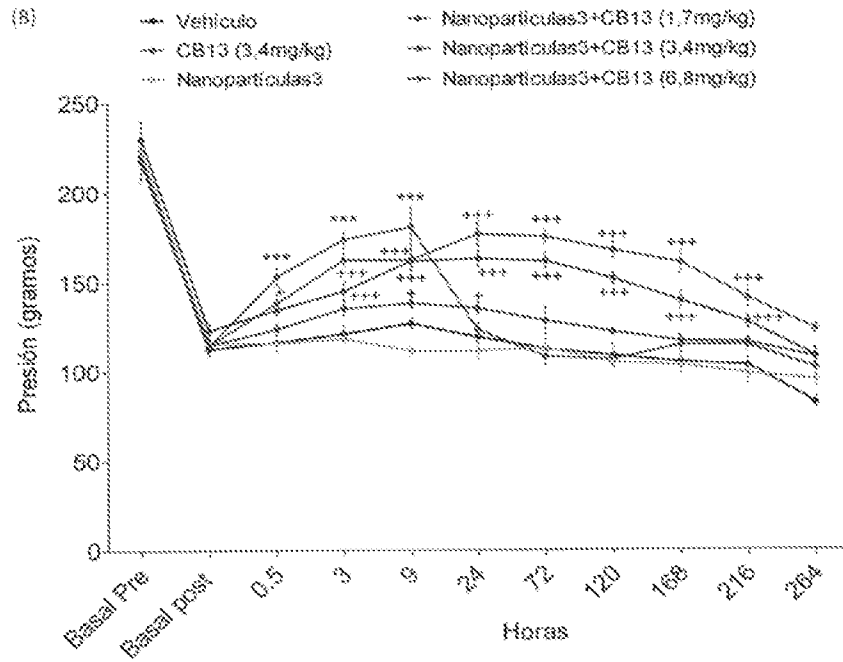


Figura 1



(A) Nanopartículas 1: sin PEGililar



(B) Nanopartículas 3: PEGiladas

Figura 2