



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 277 743**

② Número de solicitud: 200501331

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 47/40** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **02.06.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.07.2007**

⑦ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edificio CACTUS, CITT-Campus Universitario Sur**  
**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Alonso Fernández, María José;**  
**García Fuentes, Marcos;**  
**Maestrelli, Francesca y**  
**Mura, Paola**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Nanopartículas que comprenden quitosano y ciclodextrina.**

⑤ Resumen:

Nanopartículas que comprenden quitosano y ciclodextrina.

La presente invención se refiere a un sistema que comprende nanopartículas para la liberación de moléculas biológicamente activas, donde las nanopartículas comprenden a) al menos un 40% en peso de quitosano o un derivado del mismo y b) menos de un 60% en peso de una ciclodextrina o un derivado de la misma, donde ambos componentes a) y b) se encuentran mezclados, sin que exista una unión covalente entre ellos. Este sistema permite una eficaz asociación de moléculas biológicamente activas, así como su posterior liberación en un entorno biológico adecuado.

ES 2 277 743 A1

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas que comprenden quitosano y ciclodextrina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a sistemas nanoparticulados para la liberación de moléculas biológicamente activas. En concreto se dirige a sistemas nanoparticulados, constituidos por una mezcla del polímero quitosano y una ciclodextrina en los cuales se puede ubicar una molécula biológicamente activa, así como a procedimientos para su obtención.

**Antecedentes de la invención**

Las nanopartículas poliméricas están siendo objeto de especial atención debido a su interés para mejorar la estabilidad y promover el transporte y liberación controlada de fármacos a determinadas regiones del organismo, superando los problemas asociados a la limitada permeabilidad de las barreras epiteliales. Entre los polímeros biodegradables, el quitosano ha recibido una gran atención en los últimos años debido a sus propiedades como mucoadhesivo (C.-M. Lehr, J. A. Bouwstra, E. H. Schacht, and H. E. Junginger, *Int. J. Pharm.*, 1992, 78, 43-48) y promotor de la absorción (P. Artursson, T. Lindmark, S. S. Davis, and L. Illum, *Pharm. Res.*, 1994, 11, 1358-1361). Además, estudios científicos, avalan al quitosano como un material de aceptable perfil toxicológico (S. B. Rao and C. P. Sharma, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, 34, 21-28), que ya ha sido aprobado por la FDA como aditivo en alimentación animal (J. D. McCurdy, *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, 1992, pp. 757-764). El quitosano [ $\alpha(1\rightarrow4)$  2-amino 2-deoxy- $\beta$ -D-Glucano] es un polisacárido de origen natural procedente de la deacetilación de la quitina. Sin embargo, en la práctica, los quitosanos utilizados como suplemento alimenticio o para aplicaciones médicas son polímeros aleatorios de monómeros acetilados y deacetilados.

Las nanopartículas de quitosano han sido ampliamente estudiadas como vehículos para la administración trans-mucosa de un amplio número de moléculas terapéuticas (A. M. De Campos, Y. Diebold, E. L. Carvalho, A. Sanchez, and M. J. Alonso, *Pharm. Res.*, 2004, 21, 803-810; R. Fernández-Urrusuno, P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, *Pharm. Res.*, 1999, 16, 1576-1581; A. Prokov, E. Kozlov, G. W. Newman, and M. J. Newman, *Biotechnology and bioengineering*, 2002, 78, 459-466; A. Vila, A. Sanchez, K. Janes, I. Behrens, T. Kissel, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 123-131). Una característica destacable de estos sistemas de partículas es su capacidad para mejorar las características de absorción de moléculas con una baja permeabilidad (R. Fernández-Urrusuno, P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, *Pharm. Res.*, 1999, 16, 1576-1581; A. Vila, A. Sanchez, K. Janes, I. Behrens, T. Kissel, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 123-131). Si bien, las nanopartículas de quitosano han mostrado ser capaces de asociar con eficacia fármacos hidrófilos, estos sistemas presentan habitualmente limitaciones para la asociación de fármacos hidrófobos y en particular, aquellos con una baja solubilidad acuosa. En este momento, tan sólo se ha recogido una referencia de utilización de nanopartículas de quitosano con un fármaco de muy baja solubilidad (A. M. De Campos, A. Sanchez, and M. J. Alonso, *Int. J. Pharm.*, 2001, 224, 159-168), si bien, en este estudio, fue necesaria la utilización de un método de preparación que requiere el uso de solventes orgánicos.

Por su parte, las ciclodextrinas son conocidas como agentes complejantes de moléculas poco solubles y como vehículos para la administración de principios activos. Entre ellas las ciclodextrinas modificadas químicamente son en la actualidad las más utilizadas en tecnología farmacéutica por su mayor versatilidad química. Así, por ejemplo, la sustitución de los hidroxilos con grupos metilo, hidroxipropil o carboximetil confiere a las moléculas mayor hidrosolubilidad y mejores características de toxicidad. Otras ciclodextrinas permiten dotar a los complejos de solubilidad reducida (utilizada para la formulación de sistemas de liberación sostenida) o solubilidad dependiente de la temperatura.

Recientemente, se han puesto de manifiesto otras utilidades potenciales de las ciclodextrinas como excipientes farmacéuticos. Así, la complejación en ciclodextrinas ha mostrado ser capaz de reducir la cinética de degradación de ciertos fármacos lábiles, o la tendencia a la formación de agregados inactivos de péptidos como la insulina. Además, se ha demostrado que ciertas ciclodextrinas presentan la capacidad de promover la absorción de fármacos debido a que producen ligeras desestructuraciones en las membranas celulares por complejación de sus lípidos.

Existen diversos documentos que describen la utilización conjunta de ciclodextrinas y quitosano como polímero en disolución, geles o como matrices macroscópicas sólidas (US2002150616, US5476654, US5330764, US6677346, US6497901, US5849327). La solicitud de patente americana US2002150616 propone una mezcla consistente en un fármaco poco soluble, una ciclodextrina y un polímero hidrófilo. EP0730869, describe sistemas de liberación de fármacos compuestos también por mezclas de polímeros y ciclodextrinas.

Los documentos US5843347, US5840341 y US5639473 describen composiciones de polímero en disolución, en partículas macroscópicas o micropartículas. Los métodos descritos para la formación de partículas como la extrusión (US5843347) o la formación de emulsiones agua en aceite (US5639473) no permiten la obtención de partículas de tamaño inferior a varios micrómetros.

WO9961062 hace referencia a la preparación de micropartículas poliméricas con ciclodextrinas, donde las ciclodextrinas tienen la función de proteger al fármaco de posibles interacciones desfavorables con la matriz de polímero. La patente US6630169, describe la formación de microestructuras como vehículos de vacunas por vías transmucosas.

5 La patente US5639473 se refiere a la modificación mediante reticulación con grupos disulfuro de polímeros hidrófilos (como el quitosano) u oligosacáridos (como ciclodextrinas). El método propuesto, da lugar a sistemas particulados de entre 0.1 y 20 micrómetros según la descripción de dicha invención.

10 WO03027169 describe la formación de derivados de polímeros hidrófilos con ciclodextrinas unidas covalentemente y su utilidad para la formación de sistemas farmacéuticos (incluidas micro- y nanopartículas).

En la patente US619757 se describe un método de preparación que incluye la reticulación en emulsión de los poli- u oligosacáridos componentes de la matriz para dar lugar a uniones tipo éter entre estas moléculas.

15 Las patentes US5700459 y US6649192 describen métodos para la formación de nanopartículas de quitosano para aplicaciones farmacéuticas. En ambas patentes, las nanopartículas son formadas mediante la interacción de un polímero (como el quitosano) con un polianión (como el tripolifosfato). US5700459 menciona el posible uso de unas ciclodextrinas (aminociclodextrinas) como material sustitutivo de otro potencial polímero como el quitosano.

20 WO9704747 propone la encapsulación de fármacos o complejos fármaco-ciclodextrinas en matrices de hidrogel nanométricas que pueden ser posteriormente recubiertas por liposomas y/o adyuvantes de la mucoadhesión. El método propuesto requiere la precipitación del polímero desde una fase orgánica en una acuosa, y los fármacos con ciclodextrina son añadidos en la fase acuosa donde precipita el polímero, y no en conjunto con este. Este factor en el procedimiento, puede dar lugar a encapsulaciones poco eficientes de ciertos fármacos.

25 Conviene resaltar que las técnicas de microencapsulación destinadas a la formación de micropartículas difieren generalmente de las nanotecnologías aplicadas a la formación de nanopartículas. WO 9804244 describe la formación de nanopartículas de quitosano.

### 30 **Breve descripción de la invención**

Los inventores han encontrado que un sistema constituido por nanopartículas de quitosano y una ciclodextrina, permite una eficaz asociación de moléculas biológicamente activas, así como su posterior liberación en un entorno biológico adecuado. Estas nanopartículas presentan una capacidad mejorada de encapsular o asociar fármacos hidró-  
35 fobos con respecto a las nanopartículas de quitosano sin ciclodextrina. Además, las ciclodextrinas aportan características nuevas al sistema nanoparticulado como una mejor protección de la molécula biológicamente activa asociada así como un mayor poder promotor de la absorción especialmente para aquellas moléculas poco permeables.

40 Así, un objeto de la presente invención se dirige a un sistema que comprende nanopartículas para la liberación de una molécula biológicamente activa, donde las nanopartículas comprenden a) al menos un 40% en peso de quitosano o un derivado del mismo y b) menos de un 60% en peso de una ciclodextrina o un derivado de la misma, donde ambos componentes a) y b) se encuentran mezclados sin que existan uniones covalentes.

45 Opcionalmente las nanopartículas pueden comprender además un agente reticulante fónico que permite la gelificación del quitosano en forma de estructuras nanométricas.

La expresión "molécula biológicamente activa" tiene un sentido amplio y comprende moléculas tales como fármacos de bajo peso molecular, polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, moléculas basadas en ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas. Moléculas biológicamente activas particularmente adecuadas son los fármacos de clase  
50 2 (hidrosolubles no permeables), 3 (hidrofóbicos permeables) y 4 (hidrofóbicos no permeables) según la definición de la FDA y muy especialmente los de clase 4. En una variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene como función prevenir, paliar, curar o diagnosticar enfermedades. En otra variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene una función cosmética.

55 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o vacuna que comprende las nanopartículas definidas anteriormente. En un aspecto preferente, la composición o vacuna es para administración por vía mucosa.

60 En otro aspecto la invención se dirige a una composición cosmética que comprende las nanopartículas definidas anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina en cuyo seno puede estar retenida una o más moléculas biológicamente activas como puede ser un fármaco, una vacuna, o material genético. Asimismo, atrapados en la nanoestructura se pueden encontrar péptidos,  
65 proteínas o polisacáridos que no son considerados moléculas biológicas activas "per se" pero que pueden contribuir a la eficacia del sistema de administración.

Un último aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un sistema para la liberación de una molécula biológicamente activa tal como se ha definido, que comprende:

- a. preparación de una disolución de quitosano o un derivado del mismo en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;
- b. preparación de una disolución de una ciclodextrina o un derivado de la misma en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar y, opcionalmente un agente reticulante; y
- c. mezclado, bajo agitación, de las disoluciones de las etapas a) y b) de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina.

u opcionalmente:

- a. preparación de una disolución del quitosano o un derivado del mismo y una ciclodextrina o un derivado de la misma en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;
- b. preparación de una disolución del agente reticulante en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;
- c. mezclado, bajo agitación, de las disoluciones de las etapas a) y b) de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina.

La molécula biológicamente activa se puede incorporar directamente a las disoluciones de las etapas a) ó b), no obstante, en una variante del procedimiento la molécula activa puede disolverse previamente a la adición a las fases a) ó b) en medio acuoso o en una mezcla de agua y un disolvente polar.

#### Descripción detallada de las figuras

Figura 1: Imágenes de TEM de formulaciones de quitosano-(hidroxipropil-β-ciclodextrina). Formulaciones preparadas con 25 mM hidroxipropil-β-ciclodextrina y 2 mg/ml de tripolifosfato (imagen izquierda) o 1.25 mg/ml (imagen derecha).

Figura 2: Imagen de SEM de formulaciones de quitosano-(hidroxipropil-β-ciclodextrina). Formulación preparada a partir de 25 mM de ciclodextrina y 2 mg/ml de tripolifosfato.

Figura 3: Perfil de liberación de los fármacos triclosán y furosemida a partir de formulaciones de quitosano-(hidroxipropilciclodextrina). Formulaciones: TRIC HPαCD (formulación de triclosán con hidroxipropil-α-ciclodextrina), TRIC HPβCD (formulación de triclosán con hidroxipropil-β-ciclodextrina), FUR HPαCD (formulación de furosemida con hidroxipropil-α-ciclodextrina), FUR HPβCD (formulación de furosemida con hidroxipropil-β-ciclodextrina) (Medias ± Desv. Est., n=3).

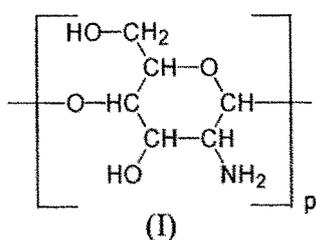
Figura 4: Gel de agarosa de nanopartículas quitosano-sulfobutilciclodextrina. Líneas: 5 (1) marcador de peso molecular, (2) ADN en solución, (3) nanopartículas sin ADN, (4) nanopartículas con ADN, (5) nanopartículas con ADN degradadas con quitosanas. Tiempo de incubación 30 minutos.

Figura 5: Imágenes de fluorescencia de células transfectadas con 1 μg de plásmido pGFP en nanopartículas de quitosano-sulfobutilciclodextrina. Niveles de transfección conseguidos a las 48 h.

#### Descripción detallada de la invención

El sistema que comprende nanopartículas para la liberación de una molécula biológicamente activa que se ha definido más arriba tiene un contenido de quitosano en la mezcla superior al 40% en peso, preferentemente está comprendido entre al menos un 40% y un 95.5% en peso. Por su parte el contenido de ciclodextrina en la mezcla es inferior al 60% en peso, preferentemente está comprendido entre 0.5% y menos del 60% en peso.

El quitosano es un polímero hidrófilo biodegradable que comprende la repetición de unidades monoméricas de fórmula (I):



## ES 2 277 743 A1

donde  $p$  es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de quitosano.

Además de estas unidades monoméricas, el quitosano generalmente contiene una proporción de unidades monoméricas en las que el grupo amino está acetilado. De hecho el quitosano se obtiene por desacetilación de la quitina (100% acetilado). Por lo general dicho grado de desacetilación se encuentra en un rango comprendido entre 30 y 95, preferentemente entre 50 y 95, lo que indica que entre un 5 y un 50% de los grupos amino están acetilados.

El quitosano empleado para la obtención de los conjugados quitosano-ciclodextrina de la presente invención tiene un peso molecular comprendido entre 1 y 2000 kDa, preferentemente entre 10 y 500 kDa, más preferentemente entre 5 y 200 kDa.

El número de unidades monoméricas que comprenden el quitosano empleado en la obtención de los conjugados quitosano-ciclodextrina está comprendido entre 5 y 5000 monómeros, particularmente entre 30 y 600, preferentemente entre 60 y 600.

En la presente invención el quitosano comprendido en la mezcla quitosano-ciclodextrina puede ser también un derivado de quitosano, entendiéndose como tal un quitosano en el que se ha modificado el grupo hidroxilo. Estos derivados incluyen, entre otros, quitosanos O-acetilados, O-alkilados u O-sulfonados, tal como se describe en *Chitin Chemistry*, Macmillan, 1992. 166. También se incluyen en la definición de derivado de quitosano las sales de quitosano, entre otras, el hidrocloreto y el glutamato de quitosano.

Hasta el momento se han sintetizado diversos derivados covalentes del quitosano tales como el trimetilquitosano, cuyo objetivo ha sido el de elevar la solubilidad del quitosano en medios de pH superior a 6.5. Asimismo existen derivados tiolados del quitosano, producidos con la finalidad de incrementar el carácter mucoadhesivo del quitosano.

Por su parte, las ciclodextrinas consisten estructuralmente en 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosil unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$ , denominándose  $\alpha$ ,  $\beta$  ó  $\gamma$ , respectivamente. La configuración tridimensional más estable de estos oligosacáridos es un toroide en la que se presentan los grupos hidroxilos primarios y secundarios hacia el disolvente. En esta conformación, la cavidad formada dentro de este toroide presenta una elevada hidrofobia, responsable junto con fuerzas de Van der Waals y puentes hidrógeno de la formación de complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y los fármacos.

Como derivado de ciclodextrina se entiende una ciclodextrina o mezclas de ellas en las cuales el/los hidrógeno/s de una parte o de todos los grupos hidroxilo de las posiciones 2-, 3- y 6- de glucosa está/n sustituido/s por otro/s grupo/s funcional/es tal/es como un grupo dihidroxialquil, un residuo sacárido, un grupo hidroxialquil, un grupo sulfonato, un grupo sulfoalquil, un grupo alquilo, un grupo alcanóilo, un grupo acetilo o un grupo benzoílo.

La ciclodextrina o sus derivados empleados en la presente invención pueden estar disponibles comercialmente o pueden sintetizarse por un método conocido *per se*. Ejemplos de ciclodextrina y sus derivados comprenden ciclodextrinas naturales (alfa, beta o gamma) hidroxipropilciclodextrinas, carboximetilciclodextrinas, sulfobutilciclodextrinas, aminociclodextrina, dimetilciclodextrina, ciclodextrina fosfato, hidroxietilciclodextrina, acetil-ciclodextrina, etilciclodextrinas, trimetilciclodextrinas, carboxietilciclodextrina, glucosilciclodextrina, 6-O-a-maltosilciclodextrinas, butilciclodextrinas, ciclodextrina sulfatadas, N,N-dietilaminoetilciclodextrina, tert-butilsililciclodextrinas, silil[(6-O-tert-butildimetil)-2,3,-di-O-acetil]-ciclodextrinas, succinil-(2-hidroxipropil)-ciclodextrinas, succinil-ciclodextrinas, sulfopropil-ciclodextrinas, policiclodextrinas. En una realización particular de la presente invención la ciclodextrina es hidroxipropil- $\alpha$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrina o mezclas de las mismas. Cualquiera de ellas puede ser utilizada en los sistemas de la invención.

El grado de sustitución promedio (GS) se refiere al promedio en número de hidroxilos sustituidos por unidad de ciclodextrina, mientras que el grado de sustitución molar (SM) se refiere al número de grupos hidroxilo por unidad de anhidroglucosa. En la presente invención las ciclodextrinas empleadas presentan un grado de sustitución promedio que oscila entre 4.2 y 7 aunque también es posible la aplicación de ciclodextrinas cuyo GS esté fuera de ese rango.

El sistema de nanopartículas de la invención se caracteriza porque se ha formado mediante precipitación espontánea de las nanopartículas tras el mezclado de una fase polianiónica, que comprende al quitosano, y opcionalmente a la ciclodextrina, con una fase polianiónica, que puede estar formada por una ciclodextrina o por un agente reticulante o por una combinación de ambos. El agente reticulante es una sal aniónica que permite la reticulación del quitosano, favoreciendo la formación espontánea de las nanopartículas. En la presente invención, el agente reticulante es una sal de polifosfato, siendo preferente el empleo de tripolifosfato sódico (TPP).

Cuando la ciclodextrina es aniónica, ésta puede constituir por sí sola la fase polianiónica y no es necesaria la presencia de TPP, ya que las nanopartículas se forman por la interacción electrostática entre la ciclodextrinas cargadas negativamente y el quitosano cargado positivamente. No obstante, la adición de TPP además de la ciclodextrina aniónica, puede, en algunos casos, cambiar la densidad de reticulación y favorecer la estabilidad de las nanopartículas. Por otro lado, en el caso de ciclodextrinas que no poseen carga aniónica (sin carga o con carga positiva), se hace necesario incorporar el TPP en la fase polianiónica para reticular el quitosano y permitir la formación de las nanopartículas.

## ES 2 277 743 A1

Las nanopartículas descritas en la presente invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula inferior a 1  $\mu\text{m}$ , preferentemente tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 10 y 800 nm. El tamaño medio de las partículas se ve influenciado principalmente por la proporción de quitosano con respecto a la ciclodextrina, por el grado de desacetilación del quitosano y también por las condiciones de fonación de las partículas (concentración de quitosano, concentración deciclodextrina, concentración de agente reticulante, cuando lo hay, y relación entre ellos).

Por otra parte, las nanopartículas pueden presentar una carga eléctrica (medida mediante el potencial Z, haciendo uso de CLK como medio de dilución) cuya magnitud puede variar desde + 5 mV hasta + 60 mV, dependiendo de las variables mencionadas. La carga positiva de las nanopartículas puede ser de interés para favorecer la interacción de las mismas con superficies mucosas. No obstante, la carga neutra puede resultar más interesante para la administración parenteral de las mismas.

Un segundo aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas previamente definidas. Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión de nanopartículas) o sólida (nanopartículas liofilizadas o atomizadas formando un polvo que se puede utilizar para elaborar granulados, comprimidos o cápsulas) para su administración bien por vía oral, bucal o sublingual, o bien en forma líquida o semisólida para su administración por vía tópica, transdérmica, ocular, nasal, vaginal o bien parenteral. En el caso de las vías no parenterales el contacto de las nanopartículas con la piel o mucosas podrá mejorarse dotando a las partículas de una importante carga positiva, lo que favorecerá su interacción con las citadas superficies cargadas negativamente. En el caso de las vías parenterales, más en concreto para la administración intravenosa, estos sistemas ofrecen la posibilidad de modular la distribución *in vivo* de los fármacos o moléculas que puedan llevar asociadas.

En un aspecto preferente la formulación se administra por vía mucosa. La carga positiva que presenta la mezcla quitosano-ciclodextrina proporciona una mejor absorción de los fármacos sobre la superficie mucosa a través de su interacción con la mucosa y las superficies de las células epiteliales que están cargadas negativamente.

Las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina son sistemas que presentan una alta capacidad de asociación de moléculas bioactivas. Esta capacidad de asociación depende del tipo de molécula incorporada así como de los parámetros de formulación señalados. En la presente invención este tipo de nanopartículas está particularmente dirigido a asociar moléculas activas hidrófobas y moléculas activas poco permeables. Por tanto, otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición que comprende nanopartículas de quitosano-ciclodextrina como las definidas previamente y al menos una molécula biológicamente activa.

El término “molécula biológicamente activa” se refiere a cualquier sustancia que se emplea en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que es empleada para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales. Estas moléculas biológicamente activas pueden incluir desde fármacos de bajo peso molecular hasta moléculas del tipo de polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos y moléculas basadas en ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas.

En una realización particular, las moléculas biológicamente activas son los fármacos de clase II (hidrosolubles no permeables), de clase III (hidrofóbicos permeables) y preferentemente de clase IV (hidrofóbicos no permeables) según la FDA. Entre las moléculas biológicamente activas que se pueden utilizar con el sistema de la invención podemos citar entre otros las siguientes moléculas de clase II: Danazol; Ketoconazole; Mefenamic acid; Nisoldipine; Nifedipine; Nicardipine; Felodipine, Atovaquone, Griseofulvin, Troglitazone Glibenclamide, Carbamazepine; de clase III: Acyclovir; Neomycin B; Captopril; Enalaprilate; Alendronate, Atenolol, Cimetidine, Ranitidine; de Clase IV: Chlorothiazide; Furosemide; Tobramycin, Cefuroxime, Itraconazole, Cyclosporin).

En una realización particular la molécula biológicamente activa es triclosán. En otra realización preferente la molécula biológicamente activa es furosemida. En otra realización preferente la molécula biológicamente activa es un plásmido ADN.

La asociación de la molécula biológicamente activa puede ocurrir por procesos combinados que comprenden interacciones no covalentes entre la molécula activa y el polímero o la asociación de la molécula activa a una ciclodextrina formando un complejo de inclusión y la interacción no covalente de este complejo con la matriz polimérica.

Con el fin de realizar una adecuada incorporación de la molécula biológicamente activa a las nanopartículas de quitosano, empleando la aproximación complejación molécula activa-ciclodextrina, es necesario primeramente solubilizar una cantidad razonable de molécula activa debido a su complejación con la ciclodextrina y, posteriormente encapsular una cantidad suficiente de complejo en la estructura de las nanopartículas.

Los sistemas nanoparticulados de la presente invención también pueden incorporar otras moléculas activas que no presentan efecto terapéutico pero que dan lugar a composiciones cosméticas. Estas composiciones cosméticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión de nanopartículas) o emulsión para su administración por vía tópica. Entre las moléculas activas que pueden incorporarse a las nanopartículas cabe citar agentes anti-acné, antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, anticaspa, blanqueadores de piel, bronceadores, absorbentes de luz UV, enzimas, biocidas cosméticos, entre otros.

## ES 2 277 743 A1

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una vacuna que comprende las nanopartículas previamente definidas y un antígeno. La administración de un antígeno por parte del sistema constituido por las nanopartículas permite conseguir una respuesta inmune. La vacuna puede comprender una proteína, polisacárido o bien puede ser una vacuna ADN. Estrictamente hablando, una vacuna ADN es una molécula de ADN que codifica la expresión de un antígeno que dará lugar a una respuesta inmune.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de nanopartículas de quitosano-ciclodextrina como las definidas previamente, que comprende:

- a) preparación de una disolución del quitosano o un derivado del mismo en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;
- b) preparación de una disolución de ciclodextrina o un derivado de la misma en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar y, opcionalmente un agente reticulante; y
- c) mezclado, bajo agitación, de las disoluciones de las etapas a) y b) de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina,

u opcionalmente:

- a. preparación de una disolución del quitosano o un derivado del mismo y una ciclodextrina o un derivado de la misma en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;
- b. preparación de una disolución del agente reticulante en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;
- c. mezclado, bajo agitación, de las disoluciones de las etapas a) y b) de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina.

Como disolventes polares pueden emplearse disolventes no tóxicos, entre otros, acetonitrilo, alcoholes y acetona. Asimismo, el medio acuoso utilizado puede contener sales de distinta naturaleza.

En una variante del procedimiento la relación en masa quitosano/ciclodextrina/agente reticulante resultante está comprendida entre 4/4/1 y 4/80/1. No obstante, el empleo de relaciones mayores quitosano frente a ciclodextrina o frente a agente reticulante también es posible dependiendo del tipo de ciclodextrina empleado. Así, para ciclodextrinas neutras (como la HP $\beta$ CD), la presencia de la ciclodextrina no parece afectar al proceso de formación de las nanopartículas.

La molécula biológicamente activa se puede incorporar directamente a las disoluciones de las etapas a) ó b), de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina conteniendo la molécula biológicamente activa. No obstante, en una variante del procedimiento la molécula puede disolverse en una etapa previa en una fase acuosa o en una mezcla de fase acuosa y disolvente polar e incorporarla a las fases a) ó b) antes de la preparación de las partículas (etapa c)). Sin embargo, para fármacos de baja solubilidad, se consiguen concentraciones superiores si la disolución de la molécula activa se realiza en la fase con la ciclodextrina.

El procedimiento de elaboración de las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina puede comprender además una etapa adicional, en la cual dichas nanopartículas son liofilizadas. Desde un punto de vista farmacéutico es importante poder disponer de las nanopartículas en forma liofilizada ya que así se mejora su estabilidad durante el almacenamiento.

### Ejemplos

Las propiedades fisico-químicas de las formulaciones de distinta composición y de diferente relación de polímeros han sido caracterizadas empleando las técnicas de espectroscopia de correlación de fotónica (PCS) y anemometría láser-Doppler. La morfología de las nanopartículas se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La composición de las nanopartículas preparadas se estudio mediante el uso de técnicas de análisis elemental. Este estudio evidenció la presencia de mezclas quitosano-ciclodextrina en las matrices de las nanopartículas.

#### Ejemplo 1

*Evaluación de las características de nanopartículas de quitosano-ciclodextrina en función del tipo de quitosano y de la concentración de TTP*

Se realizaron disoluciones (3 ml) de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) a concentración fija (6.29 mM) con diferentes quitosanos (CS) (0.2% p/p). Estas disoluciones se incubaron durante 24 h bajo agitación magnética y, posteriormente, fueron filtradas por un filtro de 0.45  $\mu$ m y reticuladas mediante la adición de distintos volúmenes de tripolifosfato a concentraciones de 1.25 mg/ml o 2 mg/ml de forma que se mantuvo siempre una relación de masa

## ES 2 277 743 A1

quitosano/ tripolifosfato de 4:1. Las nanopartículas fueron aisladas mediante centrifugación a 16000xg y resuspendidas en agua. El tamaño de las nanopartículas se determinó mediante espectroscopia de correlación fotónica (PCS). Los resultados relativos al tamaño medio e índice de polidispersión de las nanopartículas en función del peso molecular del quitosano empleado y de la concentración de tripolifosfato empleada como reticulante, se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

*Efecto del tamaño molecular del quitosano (CS Mw), de la presencia de HPβCD y de la concentración del agente reticulante tripolifosfato (TPP) en el tamaño medio y la polidispersión de las nanopartículas (Media ± desv. est., n=3)*

CS Mw (KDa)	concentración HPβCD (mM)	concentración TPP (mg/ml)	Tamaño (nm)	Índice de Polidispersión (P.I.)
110	0	1.25	484 ± 32	0.3
110	6.29	1.25	454 ± 19	0.3
110	0	2.0	578 ± 1	0.3
110	6.29	2.0	590 ± 1	0.2
272	0	2.0	887 ± 5	0.5
272	6.29	2.0	808 ± 0	0.5

### Ejemplo 2

*Evaluación de las características de nanopartículas de quitosano-ciclodextrina en función del tipo y concentración de ciclodextrina (concentración de TPP = 2 mg/mL)*

Se realizaron disoluciones (3 ml) de quitosano, en concreto el clorhidrato de quitosano (Protasan C1110) al 02% (p/p) con diferentes cantidades de hidroxipropilciclodextrina ( $\alpha$ - o  $\beta$ -) (0 a 25 mM). Las disoluciones fueron incubadas por 24 h bajo agitación magnética y, posteriormente, fueron filtradas a través de un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m y reticuladas mediante la adición de 0.75 ml de tripolifosfato a concentraciones de 2 mg/ml. Las nanopartículas fueron aisladas mediante centrifugación a 16000xg y resuspendidas en agua. El tamaño de las partículas resultantes y su polidispersión fueron caracterizadas mediante espectroscopia de correlación fotónica (PCS), el potencial zeta mediante anemometría láser doppler y el rendimiento de producción pesando el residuo seco de muestra de nanopartículas aisladas. Los resultados se muestran en la tabla 2.

La Figura 1 (imagen izquierda) y la Figura 2 muestran la morfología de unas partículas preparadas a partir de 25 mM de HPβCD analizadas mediante TEM y SEM respectivamente, confirmando la formación de nanopartículas esféricas.

TABLA 2

*Efecto del tipo y concentración de la hidroxipropilciclodextrina en las características de nanopartículas quitosano-ciclodextrina (tamaño, polidispersión, potencial zeta y rendimiento de producción) (Medias ± desv. est., n=3)*

Concentración HPCD (mM)	Tipo HPCD	Tamaño (nm)	Índice de Polidispersión (P.I.)	Potencial Zeta (mV)
0	---	686 ± 1	0.5	+33.8 ± 3.4
3.14	$\alpha$	625 ± 4	0.6	+34.7 ± 2.3
	$\beta$	590 ± 1	0.3	+35.3 ± 3.8
6.29	$\alpha$	645 ± 7	0.6	+33.8 ± 0.5
	$\beta$	624 ± 0	0.3	+36.2 ± 0.5
25	$\alpha$	690 ± 3	0.4	+35.3 ± 3.8
	$\beta$	670 ± 4	0.6	+33.1 ± 3.3

## Ejemplo 3

*Evaluación de las características de nanopartículas de quitosano-ciclodextrina en función del tipo y concentración de ciclodextrina (concentración de TTP = 1.25 mg/mL)*

Se realizaron disoluciones (3 ml) de quitosano (Protasan C1110) al 02% (p/p) con diferentes cantidades de hidroxipropilciclodextrina ( $\alpha$ - o  $\beta$ -) (0 a 25 mM). Las disoluciones fueron incubadas por 24 h bajo agitación magnética y, posteriormente, las disoluciones fueron filtradas a través de un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m y reticuladas mediante la adición de 1.2 ml de tripolifosfato a concentraciones de 1.25 mg/ml. Las nanopartículas fueron aisladas mediante centrifugación a 16000xg y resuspendidas en agua. El tamaño de las partículas resultantes y su polidispersión fueron caracterizadas mediante espectroscopia de correlación fotónica (PCS), el potencial zeta mediante anemometría láser doppler y el rendimiento de producción pesando el residuo seco de muestra de nanopartículas aisladas. Los resultados se muestran en la tabla 3.

La Figura 1 (imagen derecha) muestra la morfología de unas partículas preparadas a partir de 25 mM de HP $\beta$ CD analizadas mediante TEM.

TABLA 3

*Efecto del tipo y concentración de la hidroxipropilciclodextrina en las características de nanopartículas quitosano-ciclodextrina (tamaño, polidispersión, potencial zeta y rendimiento de producción) (Medias  $\pm$  Est. Desv., n=3)*

Concentración HPCD (mM)	Tipo HPCD	Tamaño (nm)	Indice de Polidispersión (P.I.)	Potencial Zeta (mV)	Rendimiento de Producción (%)
0	---	484 $\pm$ 32	0.3	+37.6 $\pm$ 0.9	42 $\pm$ 7
3.14	a	410 $\pm$ 29	0.2	+36.9 $\pm$ 0.6	45 $\pm$ 6
	$\beta$	456 $\pm$ 37	0.3	+34.2 $\pm$ 1.0	51 $\pm$ 6
6.29	a	398 $\pm$ 14	0.2	+35.9 $\pm$ 3.8	48 $\pm$ 7
	$\beta$	454 $\pm$ 19	0.3	+34.8 $\pm$ 3.2	54 $\pm$ 4
25	a	361 $\pm$ 18	0.2	+35.8 $\pm$ 1.7	65 $\pm$ 9
	$\beta$	443 $\pm$ 27	0.5	+29.8 $\pm$ 2.9	74 $\pm$ 3

Los resultados obtenidos en los ejemplos 2 y 3 demuestran que la inclusión de las ciclodextrinas influye en el tamaño de las nanopartículas resultantes pero sin variar en exceso su valor. Por lo que se refiere al potencial Z, las nanopartículas preparadas en presencia de ciclodextrinas, presentan valores muy similares. De estos datos se deduce que las ciclodextrinas no interfieren en el proceso de formación de las nanopartículas y que no están necesariamente asociadas a ellas.

Por su parte, el rendimiento de producción se incrementa notablemente al aumentar la concentración de ciclodextrina.

## Ejemplo 4

*Evaluación de la solubilidad de triclosán, de la eficacia de encapsulación y de su carga en nanopartículas en función del tipo y concentración de ciclodextrina*

Se obtuvieron nanopartículas de quitosano-ciclodextrina de acuerdo con el método expuesto en el ejemplo 2, sólo que añadiendo a las disoluciones iniciales una cantidad del fármaco triclosán suficiente para sobresaturar la disolución. El fármaco no disuelto por la mezcla ciclodextrina-polímero, fue descartado en el proceso de filtración (a través de 0.45  $\mu$ m) que se realiza previamente a la reticulación del polímero mediante entrecruzamiento ionotrópico (ver ejemplo 2). La tabla 4 muestra la solubilidad alcanzada para el triclosán en las disoluciones iniciales utilizadas para la formación de las partículas, la eficacia de encapsulación del triclosán en las nanopartículas y la carga de triclosán alcanzada en estas nanopartículas. El triclosán se midió mediante un método espectrofotométrico ( $\lambda=280$  nm).

## ES 2 277 743 A1

La eficacia de encapsulación (EE) se refiere al porcentaje de fármaco que es atrapado en el sistema quitosano-ciclodextrina respecto a la cantidad de fármaco adicionado en el proceso de preparación de las nanopartículas. La carga del fármaco se determina indirectamente a partir del cálculo del fármaco no encapsulado que permanece disuelto en el medio de suspensión de las nanopartículas. La diferencia entre este valor y el contenido teórico del fármaco se toma como la cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas. El porcentaje de carga de fármaco que aparece en la tabla es el porcentaje referido a la cantidad de fármaco encapsulado en 100 mg de nanopartícula.

TABLA 4

*El efecto del tipo y concentración de la ciclodextrina empleada en la solubilización del triclosán, la eficacia de encapsulación resultante (EE) y su carga en las nanopartículas finales.*  
(Media  $\pm$  Desv. Est., n=3)

Tipo HPCD	Concentración HPCD (mM)	Solubilidad del Triclosan (mg/L)	Triclosan EE (%)	Carga de Triclosan (%)
---	0	68 $\pm$ 17	32.1 $\pm$ 8	0.8 $\pm$ 0.3
$\beta$	3.14	211 $\pm$ 24	18.4 $\pm$ 7	1.1 $\pm$ 0.2
$\beta$	6.29	588 $\pm$ 18	13.8 $\pm$ 3	2.2 $\pm$ 0.1
$\beta$	25	1120 $\pm$ 13	13.8 $\pm$ 5	3.1 $\pm$ 0.1
a	25	870 $\pm$ 59	12.7 $\pm$ 4	2.0 $\pm$ 0.1

### Ejemplo 5

*Evaluación de la solubilidad de furosemida, de la eficacia de encapsulación y de su carga en nanopartículas en función del tipo y concentración de ciclodextrina*

Se realizaron nanopartículas de quitosano-ciclodextrina de acuerdo con el método expuesto en el ejemplo 3, pero añadiendo a las disoluciones iniciales una cantidad del fármaco furosemida suficiente para sobresaturar la disolución. El fármaco no disuelto por la mezcla ciclodextrina-polímero, fue descartado en el proceso de filtración (a través de 0.45  $\mu$ m) que se realiza previamente a la reticulación del polímero (ver ejemplo 3). La tabla 5 muestra la solubilidad alcanzada para la furosemida en las disoluciones iniciales utilizadas para la formación de las partículas, la eficacia de encapsulación de la furosemida en las nanopartículas y la carga de furosemida alcanzada en estas nanopartículas. La furosemida se midió mediante un método espectrofotométrico ( $\lambda=230$  nm). Para la determinación de la cantidad de furosemida encapsulada, se determinó la cantidad de triclosán en el sobrenadante de las partículas tras su aislamiento (cantidad no asociada) y se calculó la diferencia.

TABLA 5

*El efecto del tipo y concentración de la ciclodextrina empleada en la solubilización del furosemida, la eficacia de encapsulación resultante (EE) y su carga en las nanopartículas finales.*  
(Media  $\pm$  Desv. Est., n=3)

Tipo HPCD	Concentración HPCD (mM)	Solubilidad Furosemida (mg/L)	Furosemida EE (%)	Carga de Furosemida (%)
---	0	7.8 $\pm$ 1.3	22.3 $\pm$ 1.4	0.23 $\pm$ 0.07
$\beta$	3.14	42.3 $\pm$ 2.4	17.1 $\pm$ 3.0	0.89 $\pm$ 0.04
$\beta$	6.29	95.4 $\pm$ 10.1	12.1 $\pm$ 1.3	1.43 $\pm$ 0.24
$\beta$	25	387.3 $\pm$ 10.3	7.2 $\pm$ 3.1	2.39 $\pm$ 0.72
a	25	253.5 $\pm$ 9.8	8.8 $\pm$ 2.7	1.92 $\pm$ 0.55

## Ejemplo 6

*Liberación del fármaco triclosán o furosemida de las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina*

5 Se realizaron nanopartículas de quitosano-ciclodextrina con triclosán y furosemida. Para la realización de la formulación con triclosán, se siguió el proceso descrito en el ejemplo 4 (formulaciones con 25 mM de HPCD  $\alpha$  o  $\beta$ ) y para la formulación de furosemida, el método descrito en el ejemplo 5 (formulaciones con 25 mM de HPCD  $\alpha$  o  $\beta$ ). Las nanopartículas fueron aisladas y resuspendidas en un tampón acetato (pH 6.0, baja fuerza iónica). Las nanopartículas fueron incubadas en este medio en agitación horizontal (100 rpm) a 37°C. A diversos tiempos (0.5, 1.5 y 4.5 h), se tomaron muestras de los medios de incubación, se aisló el fármaco en disolución (centrifugación a 200000xg por 30 min) y se valoró por métodos espectrofotométricos tal como esta descrito en los ejemplos 4 y 5. El perfil de cesión del fármaco de las formulaciones preparadas se recoge en la figura 3.

## Ejemplo 7

15 *Evaluación de la solubilidad de triclosán, de la eficacia de encapsulación y de su cargas en nanopartículas en función del tipo y concentración de ciclodextrina*

20 Se prepararon disoluciones en una mezcla 80% agua y 20% etanol (3 ml) de quitosano (Protasan C1110, 0.2%), HP $\beta$ CD (0, 1.28 y 2.56 mM) y triclosán en cantidad suficiente para sobresaturar la disolución. Estas disoluciones fueron incubadas por 24 h bajo agitación magnética y, posteriormente, filtradas a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m y reticuladas mediante la adición de 1.2 ml de tripolifosfato disuelto en una mezcla 80% agua y 20% etanol a concentración de 1.25 mg/ml. Las nanopartículas fueron aisladas mediante centrifugación a 16000xg y resuspendidas en agua. El tamaño de las partículas resultantes y su polidispersión fueron caracterizadas mediante espectroscopia de correlación fotónica (PCS). La cantidad de fármaco encapsulado fue determinado mediante degradación de una alícuota de las nanopartículas resuspendidas con la enzima quitosanasas (Chitosanase-RD, Pias Co, Japón), y su valoración se realizó mediante espectrofotometría ( $\lambda=280$  nm). Los resultados se muestran en la tabla 6.

30

TABLA 6

*El efecto de la concentración de la ciclodextrina empleada en la solubilización del triclosán en la fase empleada para la preparación de las nanopartículas, la eficacia de encapsulación resultante de las nanopartículas (EE) y su carga final en las nanopartículas. (Media  $\pm$  Desv. Est., n=3)*

35

Concentración HP $\beta$ CD (mM)	Tamaño (nm)	Triclosan disuelta (mg/L)	Triclosan EE (%)	Carga de Triclosan (%)
0	499 $\pm$ 33	719 $\pm$ 79	22.3 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 0.9
1.28	568 $\pm$ 25	2536 $\pm$ 283	37.7 $\pm$ 7.3	7.4 $\pm$ 1.3
2.56	517 $\pm$ 14	3521 $\pm$ 213	33.5 $\pm$ 2.7	8.7 $\pm$ 0.2

50

## Ejemplo 8

55 *Evaluación del tamaño y polidispersión de nanopartículas de quitosano-ciclodextrina con o sin ADN plasmídico en función de tipo de ciclodextrina*

60 Se prepararon disoluciones de: (A) metil- $\beta$ -ciclodextrina (Me- $\beta$ -CD) (7.4 mM), tripolifosfato (1.25 mg/ml) y un plásmido codificante de la proteína fluorescente verde (pGFP) (0.5 mg/ml); y (B) sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrina (SB- $\beta$ -CD) y un plásmido codificante de la proteína fluorescente verde (pGFP) (0.5 mg/ml). Ambas disoluciones se incubaron durante un periodo de 1 h bajo agitación. Un volumen de 0.24 ml de las disoluciones A o B fueron añadidas sobre 1.2 ml de quitosano 0.1% (p/p) bajo agitación magnética formando nanopartículas. El tamaño y polidispersión de las partículas resultantes fueron caracterizadas mediante espectroscopia de correlación fotónica (PCS). Los resultados se muestran en la tabla 7.

65

TABLA 7

*El efecto del tipo de ciclodextrina en el tamaño y polidispersión de nanopartículas de quitosano-ciclodextrina con o sin ADN plasmídico. (Media  $\pm$  Desv. Est., n=3). \*Expresado como rango de valores*

Tipo ciclodextrina	Concentración ADN (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Indice de Polidispersión (P.I.)*
SB- $\beta$ -CD	0	170.8 $\pm$ 24	0.1- 0.2
SB- $\beta$ -CD	0.5	157 $\pm$ 32	0.1- 0.2
Me- $\beta$ -CD	0	232 $\pm$ 15	0.2- 0.3
Me- $\beta$ -CD	0.5	182.8 $\pm$ 40	0.1- 0.2

A la formulación de nanopartículas de quitosano-sulfobutilciclodextrina con ADN se le realizó un gel de electroforesis en agarosa previa a su aislamiento. Como controles se incluyó plásmido en disolución, la formulación sin plásmido y la formulación con plásmido degradado con quitosanasasa (Chitosanase-RD, Pias Co, Japón). Los resultados se muestran en la Figura 4.

#### Ejemplo 9

Se preparó una formulación de nanopartículas como la descrita en el ejemplo 8. Se aisló la formulación por centrifugación (16000xg, 30 min) y se resuspendió en un tampón de pH 6.0 de baja fuerza iónica. Una cantidad de formulación tal que contenía 1 o 2  $\mu$ g de ADN fue incubada con cultivos celulares. Los resultados de transfección celular conseguidos se muestran en la figura 5. La imagen de fluorescencia muestra las colonias celulares que expresan la proteína fluorescente verde como consecuencia de la transfección por el sistema nanopartícula-pGFP. El plásmido sin vehículo no mostró capacidad para transfectar las células, es decir que no se observaron ningunas colonias celulares fluorescentes.

#### Ejemplo 10

*Efecto del tipo de ciclodextrina y de la relación de masa entre quitosano, ciclodextrina y tripolifosfato en la composición final de los sistemas nanoparticulados*

Nanopartículas de quitosano-HP $\beta$ CD y quitosano-SB $\beta$ CD fueron preparadas como en los ejemplos 3 y 8 respectivamente. Se utilizaron cantidades diferentes de las ciclodextrinas en las disoluciones iniciales utilizadas para la preparación de las nanopartículas. La composición real de las nanopartículas (% quitosano, % ciclodextrina, % contraiones) tras su aislamiento fue determinado mediante técnicas de análisis elemental (considerando las relaciones Nitrógeno-Carbono o Nitrógeno-sulfuro). El grado de humedad en las muestras fue determinado mediante análisis termogravimétrico.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 277 743 A1

TABLA 8

*El efecto del tipo de ciclodextrina y de la relación de masa entre quitosano (CS), ciclodextrina (CD) y tripolifosfato (TPP) en la composición final de los sistemas preparados (% de peso seco). (Media  $\pm$  Desv. Est., n=3).*

*\*Aproximadamente cero*

Tipo ciclodextrina	Relación de masa CS/CD/TPP inicial	% CS	% Ciclodextrina	% Contra-iones (TPP, Na, Cl)
HPBCD	4/2/1	70 $\pm$ 1	2.8 $\pm$ 1.1	27 $\pm$ 0.5
HPBCD	4/4/1	72 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.5	24 $\pm$ 0.5
HPBCD	4/8/1	70 $\pm$ 2	10.1 $\pm$ 2.5	20 $\pm$ 0.8
SB- $\beta$ -CD	4/2/0.5	58 $\pm$ 2	31.7 $\pm$ 1.0	10.5 $\pm$ 1.9
SB- $\beta$ -CD	4/3/0.5	46 $\pm$ 3	37.1 $\pm$ 7.9	16.7 $\pm$ 9
SB- $\beta$ -CD	4/4/0	41 $\pm$ 0.2	58.6 $\pm$ 0.7	---*

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema que comprende nanopartículas para la liberación de moléculas biológicamente activas, donde las nanopartículas comprenden a) al menos un 40% en peso de quitosano o un derivado del mismo y b) menos de un 60% en peso de una ciclodextrina o un derivado de la misma, donde ambos componentes a) y b) se encuentran mezclados, sin que exista una unión covalente entre ellos.
- 10 2. Sistema según reivindicación 1 donde las nanopartículas comprenden además un agente capaz de reticular iónicamente el quitosano en forma de estructuras nanométricas.
3. Sistema según reivindicaciones 1 y 2 donde la proporción de quitosano o un derivado del mismo está comprendido entre al menos un 40% y 95.5% en peso.
- 15 4. Sistema según reivindicaciones 1 a 3 donde la proporción de ciclodextrina o un derivado de la misma está comprendido entre 0.5% y menos del 60% en peso.
- 20 5. Sistema según reivindicaciones 1 a 4 donde el grado de polimerización del quitosano o número de unidades monoméricas que comprenden el quitosano o un derivado del mismo está comprendido entre 5 y 5000, preferentemente entre 30 y 600.
6. Sistema según reivindicaciones 1 a 5 donde el quitosano o su derivado tiene un peso molecular comprendido entre 1 y 2000 kDa, preferentemente entre 10 y 500 kDa, más preferentemente entre 5 y 200 kDa.
- 25 7. Sistema según reivindicaciones 1 a 6 donde el quitosano o su derivado tiene un grado de desacetilación comprendido entre 30% y 95%, preferentemente entre 50% y 95%.
- 30 8. Sistema según reivindicaciones 1 a 7 donde la ciclodextrina se selecciona de entre ciclodextrinas naturales (alfa, beta o gamma), hidroxipropilciclodextrinas, carboximetilciclodextrinas, sulfobutilciclodextrinas, aminociclodextrina, dimetilciclodextrina, ciclodextrina fosfato, hidroxietilciclodextrina, acetyl-ciclodextrina, etilciclodextrinas, trimetilciclodextrinas, carboxietilciclodextrina, glucosilciclodextrina, 6-O- $\alpha$ -maltosilciclodextrinas, butil-ciclodextrinas, ciclodextrina sulfatadas, N,N-dietilaminoetilciclodextrina, tert-butilsililciclodextrinas, Silil[(6-O-tert-butildimetil)-2,3,di-O-acetyl]-ciclodextrinas, Succinil-(2-hidroxipropil)-ciclodextrinas, Succinil-ciclodextrinas, Sulfopropil-ciclodextrinas, policiclodextrinas.
- 35 9. Sistema según reivindicación 8 donde la ciclodextrina es hidroxipropil- $\alpha$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrina o mezclas de las mismas.
- 40 10. Sistema según reivindicaciones 1 a 9 donde la ciclodextrina presenta un grado de sustitución promedio entre 4.2 y 7.
- 45 11. Sistema según reivindicaciones 1 a 10 que además comprende una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo consistente en fármacos de bajo peso molecular, polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas.
- 50 12. Sistema según reivindicaciones 1 a 11 donde la molécula biológicamente activa es un fármaco de clase II, III o IV según las definiciones del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica adoptado por la FDA, preferentemente es un fármaco de clase IV.
13. Sistema según reivindicación 2 donde el agente reticulante es una sal de polifosfato, preferentemente tripolifosfato sódico.
- 55 14. Sistema según reivindicaciones 1 a 13 donde el tamaño medio de las nanopartículas está comprendido entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 100 y 800 nm.
15. Sistema según reivindicación 1 a 14 donde la carga eléctrica (potencial Z) está comprendido entre +5 hasta +60 mV medido en 1 mM KCl.
- 60 16. Una composición farmacéutica que comprende un sistema como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y una molécula biológicamente activa capaz de prevenir, paliar o curar enfermedades.
17. Composición según la reivindicación 16 para administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, transdérmica, ocular, nasal, vaginal o parenteral.
- 65 18. Composición según reivindicaciones 16 y 17 donde la molécula biológicamente activa se selecciona de entre polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, moléculas basadas en ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas.

## ES 2 277 743 A1

19. Composición según reivindicaciones 16 a 18 donde la molécula biológicamente activa es un fármaco de clase II, III o IV según las definiciones del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica adoptado por la FDA.

5 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 donde la molécula biológicamente activa es triclosán, furosemida ó plásmidos ADN.

21. Composición cosmética que comprende un sistema para la liberación de una molécula biológicamente activa como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

10 22. Composición cosmética según reivindicación 21 donde la molécula activa se selecciona de entre agentes anti-acné, antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, anticaspa, blanqueadores de piel, bronceadores, absorbentes de luz UV, enzimas y biocidas cosméticos.

15 23. Una vacuna que comprende un sistema para la liberación de una molécula biológicamente activa como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un antígeno.

24. Vacuna según reivindicación 23 donde el antígeno se selecciona de entre proteínas, polisacáridos y moléculas de ADN.

20 25. Procedimiento de obtención de un sistema para la liberación controlada de molécula biológicamente activa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende:

25 a) preparación de una disolución de quitosano o un derivado del mismo en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;

b) preparación de una disolución de ciclodextrina o un derivado de la misma en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar y, opcionalmente un agente reticulante; y

30 c) mezclado, bajo agitación, de las disoluciones de las etapas a) y b) de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina,

u opcionalmente:

35 a) preparación de una disolución del quitosano o un derivado del mismo y una ciclodextrina o un derivado de la misma en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;

b) preparación de una disolución del agente reticulante en medio acuoso o en una mezcla de agua con un disolvente polar;

40 c) mezclado, bajo agitación, de las disoluciones de las etapas a) y b) de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano-ciclodextrina.

45 26. Procedimiento para la obtención de nanopartículas según reivindicación 25, donde el agente reticulante es un tripolifosfato, preferentemente tripolifosfato sódico.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 y 26 donde la molécula biológicamente activa se disuelve previamente en las etapas a) o b) o en otra fase acuosa u orgánica que se adiciona sobre a) o b).

50 28. Procedimiento según la reivindicación 25, donde la molécula biológicamente activa se selecciona de entre polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, moléculas basadas en ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas.

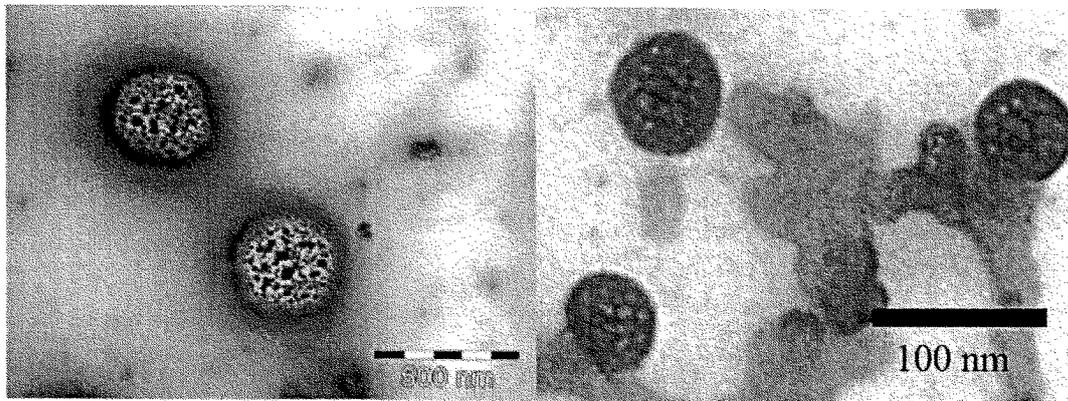
55 29. Procedimiento según reivindicaciones 25 y 28 donde la molécula biológicamente activa es un fármaco de clase II, III o IV según las definiciones del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica adoptado por la FDA, preferentemente es un fármaco de clase IV.

60 30. Composición según reivindicaciones 28 y 29 donde la molécula biológicamente activa es triclosán, furosemida ó plásmidos ADN.

60

65

**Figura 1**



**Figura 2**

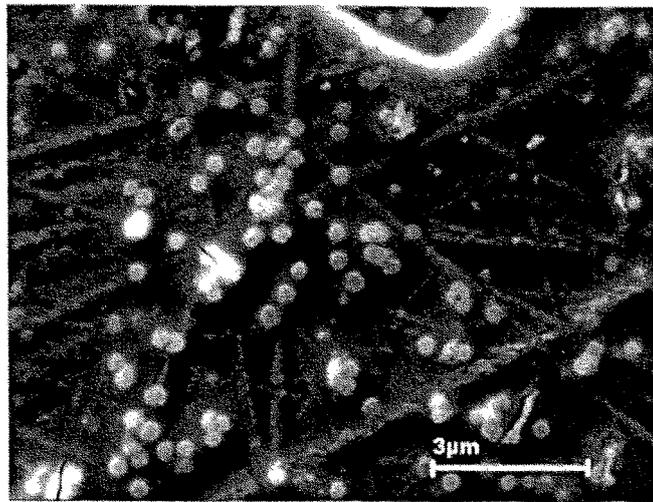
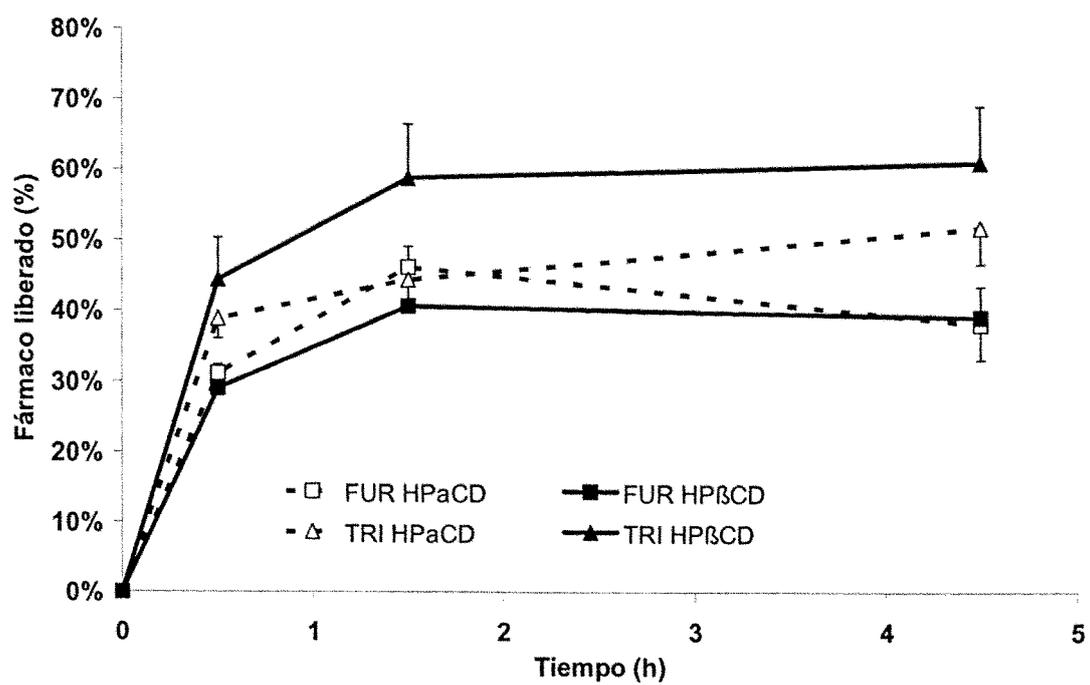
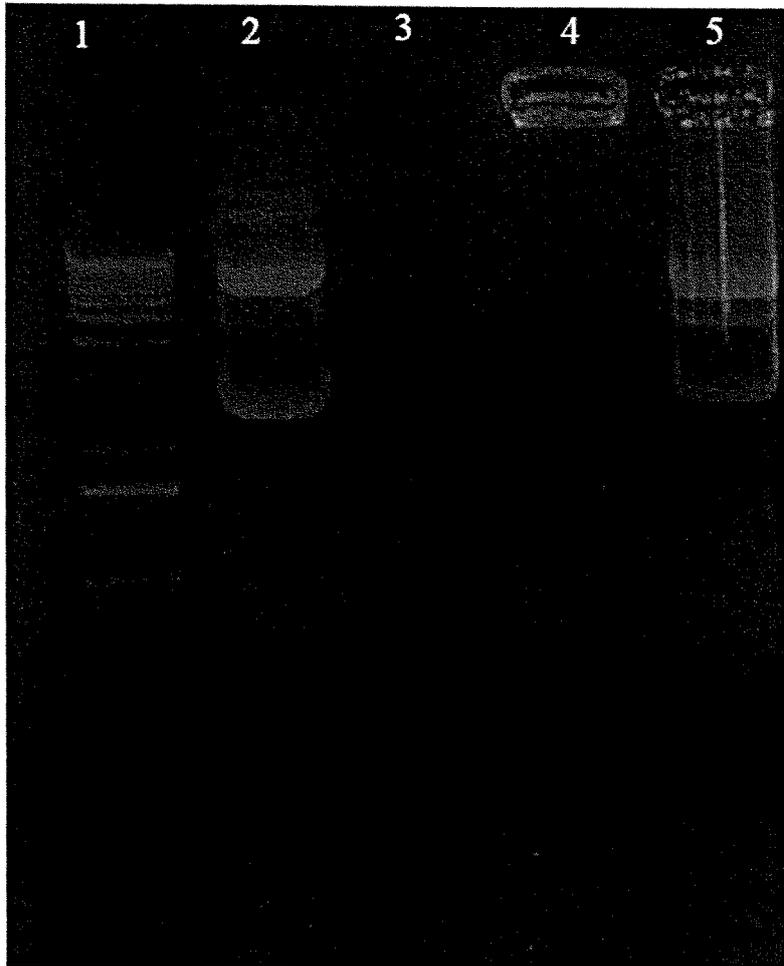


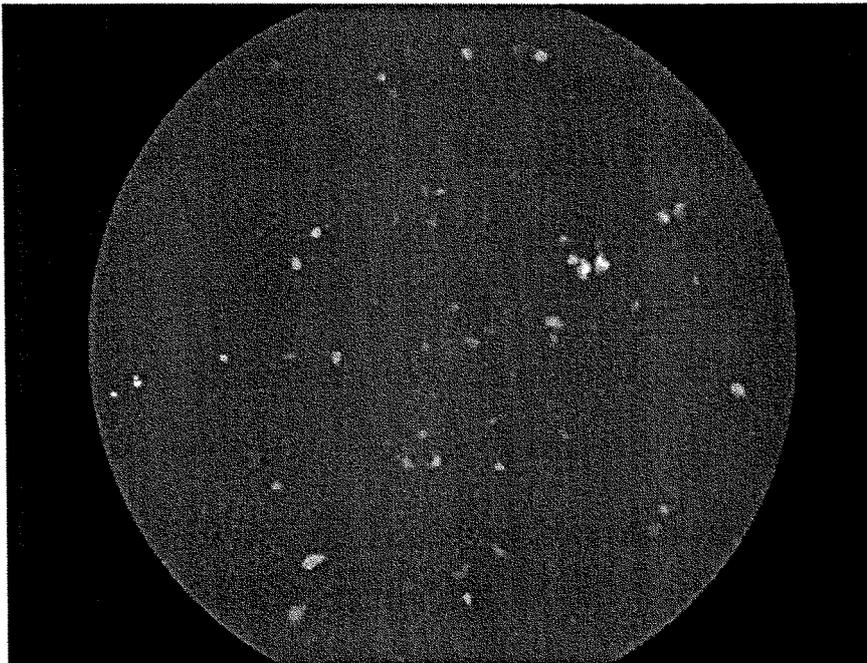
Figura 3



**Figura 4**



**Figura 5**





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 277 743

② Nº de solicitud: 200501331

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.06.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FR 2841137 A (BIOALLIANCE PHARMA SOCIÉTÉ ANONYME) 26.12.2003, página 5, línea 31 - página 11, línea 8; ejemplo II.	1,3-12, 14-25, 27-30
Y		2,13,26
Y	WO 9804244 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 05.02.1998, página 1, línea 31 - página 2, línea 6.	2,13,26

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.06.2007

Examinador

N. Vera Gutiérrez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 47/40** (2006.01)