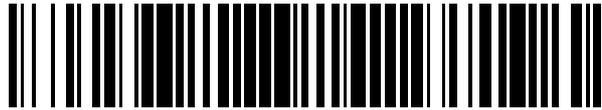


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 360 027**

21 Número de solicitud: 200902194

51 Int. Cl.:

**C08G 61/12** (2006.01)

**A61K 8/11** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **19.11.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2011**

Fecha de la concesión: **14.02.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **24.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**24.02.2012**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
EDIF CACTUS OFICINA DE INVESTIGACION Y  
TECNOLOGIA CAMPUS SUR  
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA, A CORUÑA,  
ES**

72 Inventor/es:

**GARCIA RIO, LUIS;  
LEIS FIDALGO, JOSE RAMON;  
JESUINO BASILIO, NUNO MIGUEL y  
DOS SANTOS FRANCISCO, VICTOR MANUEL**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **VESICULAS LIOFILIZABLES SIN CRIOPROTECTOR**

57 Resumen:

La invención se dirige a la formación de vesículas más estables formadas por al menos un calixareno y al menos un surfactante, cuya liofilización no requiere de crioprotectores, o incluso puede prescindirse de la liofilización, a su método de obtención y a procedimientos de liofilización y rehidratación de las mismas, así como su utilidad en diversos campos como, por ejemplo, el farmacéutico y el de sensores.

ES 2 360 027 B1

## DESCRIPCIÓN

Vesículas liofilizables sin crioprotector.

### 5 Campo de la invención

La invención se dirige a la formación de vesículas cuya liofilización no requiere de crioprotectores, a su método de obtención y a procedimientos de liofilización y rehidratación de las mismas, así como su utilidad en diversos campos como, por ejemplo, el farmacéutico y el de sensores.

10

### Estado de la técnica

La formación de vesículas nanométricas ha despertado el interés de la comunidad científica por las particulares propiedades derivadas de su tamaño. Los métodos conocidos para la preparación de vesículas son muy variados, por ejemplo, los descritos por Szoka y Papahadjopoulos, *Ann. Rev. Biophysics bioeng.* 9: 467-508 (1980). Numerosas propiedades como el tamaño de la vesícula, la polidispersidad, el potencial superficial, el grado de ionización, el comportamiento de fase termotrópico, la permeabilidad, la estabilidad física y otras dependen de la composición de la vesícula, pero puede variar en función del método de preparación.

20

Para que las vesículas puedan ser utilizadas con fines comerciales, es deseable conseguir que su tiempo de vida medio se dilate al máximo para ser fácilmente manufacturadas, transportadas y almacenadas por los intermediarios y últimos usuarios. La estabilidad de las vesículas se define generalmente como el tiempo durante el cual una preparación dada mantiene su estructura y distribución de tamaños original. La inestabilidad puede ocurrir, por ejemplo, cuando la vesícula incrementa su tamaño espontáneamente como consecuencia de la fusión de vesículas colindantes. Esto es importante puesto que las propiedades, por ejemplo las propiedades farmacocinéticas *in vivo*, pueden depender del tamaño de las vesículas.

25

En consecuencia, existen numerosas investigaciones para prolongar la estabilidad de las vesículas con fines de almacenamiento, entre las que puede destacarse la deshidratación, concretamente la liofilización. La liofilización es un proceso por el cual una sustancia se prepara en su forma seca por un rápido congelado y deshidratación en condiciones de alto vacío. Por ejemplo, en US 4,370,349 y US 4,397,34 se describen métodos para conservar vesículas utilizando técnicas de liofilización.

30

El principal inconveniente que presentan en general los métodos de liofilización es que las vesículas requieren un protector (también llamado "crioprotector") para evitar que la vesícula se agregue cuando se rehidrata, lo que conllevaría una modificación de su tamaño medio y, consecuentemente, de sus propiedades farmacológicas.

35

Sustancias hidrofílicas tales como dextrano, manitol, lactosa y polivinilpirrolidona son bien conocidas en el campo de crioprotección para células y tejidos (Mackenzie, A. P. (1976) *Develop. Boil. Standard* 36, 51-67), así como para la liofilización de productos biológicos y farmacéuticos a granel (Mackenzie, A. P. (1966) *Bull. Parenteral Drug Association* 320, 101-129). También, en US 5,089,181 y US 5,817,334 se describe el uso de crioprotectores en procesos de liofilización de liposomas.

40

A pesar de la adición de un crioprotector, después de liofilizar, su rehidratación provoca en las vesículas un cambio en el diámetro promedio con respecto a las vesículas originales. La recombinación de vesículas puede deberse a dos causas: (1) durante el proceso de enfriado, la transferencia de moléculas de agua a cristales de hielo incrementa la concentración en la disolución acuosa coexistente. Así, la separación entre las vesículas se reduce, lo cual incrementa la frecuencia de los posibles contactos intervesiculares y la probabilidad de procesos de recombinación, los cuales aumentan el tamaño medio; y/o (2) cuando el crioprotector se disuelve en la disolución y durante el proceso de enfriado, las vesículas se encuentran en un medio donde la concentración del crioprotector es extremadamente alta. Dado que las bicapas no son permeables a moléculas hidrofílicas grandes tales como suelen ser la mayoría de los crioprotectores, éstos quedan confinados en la disolución intersticial fuera de la vesícula. Esto produce un estrés osmótico sobre la vesícula, forzándola a adquirir una curvatura desfavorable, la cual puede ser liberada por procesos de recombinación, facilitando los mismos.

45

50

55

En EP 1 293 248 se describen vesículas formadas a partir de calixarenos modificados para incorporar grupos amfifílicos (preparados por esterificación del hidroxilo en posición 2 con un grupo acilo de cadena larga). Aunque se dice que las vesículas formadas con los calixarenos modificados para incorporar grupos amfifílicos no requieren la adición de un crioprotector, la preparación de dichos calixarenos modificados resulta delicada, requiere estrictas condiciones anhidras y largos tiempos de reacción.

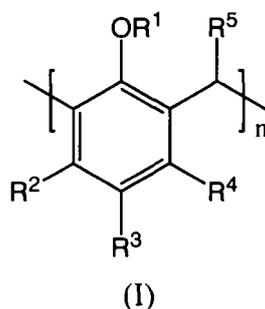
60

### Breve descripción de la invención

65

En su esfuerzo continuado por preparar vesículas más estables, los inventores han conseguido preparar vesículas que son sorprendentemente más estables.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una vesícula tal y como se define en la reivindicación 1, caracterizada porque comprende uno o más surfactantes y uno o más calixarenos de fórmula (I)



en donde

20  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_3$ , alquenilo  $C_2-C_3$ , alquinilo  $C_2-C_3$ ;

$R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, sulfonato, alquilo  $C_1-C_{20}$ , alquenilo  $C_2-C_{20}$ , alquinilo  $C_2-C_{20}$  y  $OR^6$ ;

25 en donde  $R^6$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_3$ , alquenilo  $C_2-C_3$ , alquinilo  $C_2-C_3$ ;

$R^5$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_2-C_6$ , y alquinilo  $C_2-C_6$ ; y

30  $n$  es un número entero que se selecciona de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

35 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento tal y como se define en la reivindicación 11 para preparar dicha vesícula, caracterizado porque comprende proveer en agua al menos un calixareno de fórmula (I) y al menos un surfactante, preferiblemente aplicando sonicación.

Un tercer aspecto se refiere a una vesícula obtenible por el procedimiento del segundo aspecto.

40 Un cuarto aspecto se refiere a una vesícula, tal y como se define en el primer o tercer aspecto, liofilizada o rehidratada.

Un quinto aspecto se refiere a un procedimiento que comprende la liofilización de una vesícula tal y como se ha definido en el primer o en el tercer aspecto.

45 Un sexto aspecto se refiere al uso de una vesícula tal y como se define en el primer o en el tercer aspecto en un procedimiento de liofilización.

50 Un séptimo aspecto de la invención es el uso de las vesículas tal y como se definen en el primer o en el tercer aspecto como sensores, sistemas de liberación controlada de sustancias biológicamente activas, tales como drogas o fármacos, o en la fabricación de productos cosméticos o en sistemas de conversión de energía solar fotoquímica.

Un octavo aspecto de la invención es una composición, preferiblemente, una composición farmacéuticamente aceptable, que comprende una vesícula de la invención.

55 Un noveno aspecto es una vesícula de la invención, o una composición que la comprende, para su uso como medicamento.

60 Las vesículas de la invención se forman a partir de calixarenos comercialmente accesibles o fácilmente obtenibles. También los surfactantes utilizados son comercialmente accesibles o fácilmente obtenibles. En consecuencia, todo el procedimiento de obtención de la vesícula es sencillo y no requiere condiciones de reacción especiales. Las vesículas de la invención son más estables. Pueden ser deshidratadas, preferiblemente liofilizadas, y rehidratadas sin cambios en su diámetro medio, sin necesidad de añadir crioprotectores. Más aún, después de la deshidratación, preferiblemente liofilización, las vesículas se redispersan completamente en agua sin necesidad de sonicación. También se ha observado que las vesículas de la invención después de reidratadas no forman las fases lamelares observadas en otras vesículas. 65 Incluso en algunos casos, las vesículas obtenidas son estables sin necesidad de liofilización, no habiéndose observado cambios en su estructura o propiedades después de hasta tres semanas.

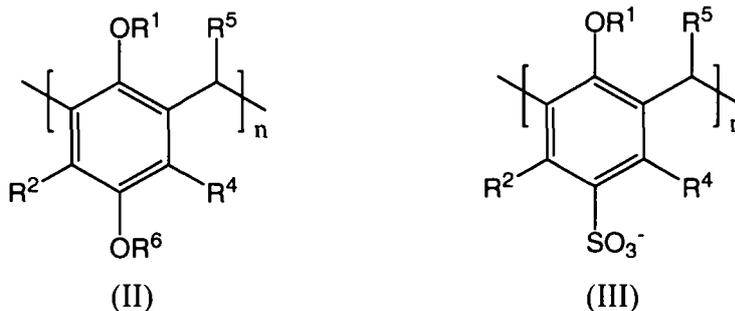
**Descripción detallada***Componentes de las vesículas*

5 Los calixarenos son macrociclos u oligómeros cíclicos en los que la unidad que se repite es un anillo aromático sustituido por al menos un hidroxilo o un hidroxilo sustituido. Se conoce una gran variedad de calixarenos. Generalmente derivan de la hidroxialquilación de un derivado de fenol, como fenol resorcinol o pirogalol, con un aldehído, como formaldehído o acetaldehído. Métodos para su obtención se describen por ejemplo en a) Gutsche, C. D., Calixarene, *Monographs in Supramolecular Chemistry*, Vol 1, Stoddart J. F. Ed., The Royal Society of Chemistry, **1989**; b) E. Da Silva, L. Memmi, A. W. Coleman, B. Rather y M. J. Zaworotko, *J. Supramol. Chem.*, **2002**, 1, 135-138; c) E. Da Silva and A. W. Coleman, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7357-7364. Muchos de ellos también son comercialmente accesibles o se pueden preparar fácilmente a partir de los mismos.

15 Habitualmente los calixarenos se nombran indicando el nombre de la unidad que se repite, indicando entre corchetes el número de veces que se repite la unidad. En caso de que exista un sustituyente en la posición de R<sup>5</sup>, éste precede al nombre del resto de la molécula seguido de un guión. Esta misma nomenclatura se sigue en el presente documento. Por ejemplo, el etil-*p-tert*-butil[5]fenol es un calixareno de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> es hidrógeno, R<sup>3</sup> es *tert*-butil, y R<sup>5</sup> es etilo, y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son hidrógeno, y en el que n es 5.

20 En una realización particular R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo. En una realización particular R<sup>2</sup> es hidrógeno. En una realización particular R<sup>4</sup> es hidrógeno. En una realización particular R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo. En una realización particular n es 4, 5, 6, 7 u 8, preferiblemente 4, 6 u 8.

25 En otra realización particular, el calixareno es un calixareno de fórmula (II) o de fórmula (III)



40 en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y n son tal y como se han definido anteriormente.

45 De acuerdo con otra realización particular, el calixareno es un *p*-sulfonatocalix[n]areno. De acuerdo con una realización particular dicho calixareno se selecciona del grupo que consiste en *p*-sulfonatocalix[4]fenol, *p*-sulfonatocalix[6]fenol, *p*-sulfonatocalix[8]fenol, más preferiblemente *p*-sulfonatocalix[4]fenol, y los correspondientes derivados metoxilo de los mismos, *p*-metoxicalix[4]benzenosulfonato, *p*-metoxicalix[6]benzenosulfonato, y *p*-metoxicalix[8]benzenosulfonato.

50 Dada la configuración espacial que adquieren, los calixarenos pueden ser quirales y la presente invención incluye tanto los enantiómeros individuales, como mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas racémicas. Los calixarenos utilizados son preferiblemente solubles en agua.

55 De acuerdo con una realización particular, el surfactante es un surfactante iónico, más particularmente se elige del grupo de los tetraalquilamonio o mezclas de los mismos, por ejemplo, tetraalquilamonios de fórmula R<sup>7</sup>[R<sup>8</sup>][R<sup>9</sup>][R<sup>10</sup>]N<sup>+</sup>A<sup>-</sup>, en donde cada R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> se selecciona independientemente del grupo de los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, y A<sup>-</sup> es un contra-anión, por ejemplo, un halogenuro (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> o I<sup>-</sup>), un ión acetato, un ión fosfato o un ión carbonato, preferiblemente Cl<sup>-</sup> o Br<sup>-</sup>. En una realización particular, al menos uno de R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> se selecciona independientemente del grupo de los alquilos C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>, del grupo de los alquilos C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> o del grupo de los alquilos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>. En otra realización particular, el surfactante es un alquil trimetilamonio, por ejemplo, de fórmula R<sup>7</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>A<sup>-</sup>. De acuerdo con una realización particular, R<sup>7</sup> es un alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>, un alquilo C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> o se selecciona del grupo de los alquilos C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>. De acuerdo con otra realización particular, el surfactante se selecciona del grupo que consiste en bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro de tetraoctilamonio, bromuro de cetil trimetil amonio, [(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br], y bromuro de tetrabutilamonio.

65 En otra realización particular, el surfactante es un surfactante iónico con dos o más cabezas iónicas. En otra realización particular el surfactante tiene dos cabezas iónicas. Por "cabeza iónica" se entiende un grupo iónico, preferiblemente catiónico. En otra realización particular, dicho surfactante iónico con dos o más cabeza iónicas comprende dos o

más grupos trialquilamonio cada uno seleccionado independiente de grupos trialquilamonio de fórmula  $-[R^8][R^9][R^{10}]N^+A^-$  en donde cada uno de  $A^-$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  individualmente es tal y como se han definido anteriormente. De acuerdo con otra realización, el surfactante es un alquiliden-di[trialquilamonio], por ejemplo, de fórmula  $A^-N^+[R^8][R^9][R^{10}]-R^{11}-[R^8][R^9][R^{10}]N^+A^-$ , en donde cada uno de  $A^-$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  individualmente es tal y como se han definido anteriormente, y  $R^{11}$  es un grupo alquiliden  $C_1-C_{30}$ , un grupo alquiliden  $C_{10}-C_{20}$ , un alquiliden  $C_{12}-C_{20}$  o se selecciona del grupo de los alquilidenos  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{18}$ . De acuerdo con otra realización preferida, el surfactante es de fórmula  $A^-N^+[R^8][R^9][R^{10}]-(CH_2)_p-[R^8][R^9][R^{10}]N^+A^-$ , en donde cada uno de  $A^-$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  individualmente es tal y como se han definido anteriormente, y p es un número entero entre 1 y 30. De acuerdo con otra realización preferida, p es un número entero entre 10 y 25, entre 10 y 20 o entre 10 y 16. En una realización particular, p es un número entero que se selecciona del grupo formado por 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, más particularmente, 12. Las vesículas formadas con estos surfactantes son especialmente estables y de fácil preparación.

“Alquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, que tiene los átomos de carbono indicados en cada caso, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono, más preferiblemente uno a cuatro, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. “Alquiliden” se refiere al mismo radical pero que está unido al resto de la molécula por dos enlaces sencillos, preferiblemente un grupo  $-(CH_2)_p-$ , en donde p es un número entero entre 1 y 30.

“Alqueno” y “alquino” se refieren a radicales de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contienen al menos una insaturación doble o triple, respectivamente, que tiene los átomos de carbono indicados en cada caso, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono, más preferiblemente uno a cuatro, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, etenilo, n-propenilo, i-propenilo, n-butenilo, n-pentenilo, etinilo, etc.

#### *Síntesis de las vesículas, su liofilización y rehidratación*

Las vesículas de la invención se obtienen mezclando el correspondiente calixareno y el surfactante en agua. En una realización particular, la mezcla se somete a sonicación hasta que las vesículas se encuentran dispersadas. Esto requiere típicamente entre 1 y 180 minutos, más típicamente entre 10 y 60 minutos. El experto en la materia puede determinar en cada caso el tiempo de sonicación en función del aspecto de la mezcla. La concentración de calixareno puede variar entre 1 mM y 5 mM y el rango de concentraciones del surfactante puede variar entre 1 mM y 20 mM. La temperatura típica a la que se forman las vesículas se sitúa entre los 0 y los 90°C, preferiblemente entre 60 y 80°C. El experto en la materia puede variar estos parámetros en su trabajo rutinario.

La liofilización de las vesículas de la invención puede hacerse siguiendo las condiciones habituales de congelación y alto vacío típicas de este procedimiento, sin ninguna limitación particular. Lo mismo ocurre para el procedimiento de rehidratación. Las condiciones y el material necesario pueden encontrarse en libros de referencia como, por ejemplo, Jennings T.A., *Lyophilization-introduction and Basic Principles*, Interpharm/CRC Press, Colorado, USA, 1999. El material obtenido tras la liofilización es un polvo generalmente blanco que se rehidrata fácilmente.

Aspectos adicionales de la invención son vesículas obtenibles mediante el procedimiento de preparación arriba descrito, dichas vesículas obtenibles después de la liofilización y dichas vesículas obtenibles después de su rehidratación.

#### *Propiedades y Aplicaciones*

Las vesículas de la invención son útiles en un amplio abanico de campos. En primer lugar, su tamaño después de la síntesis se encuentra en el rango nanométrico, es decir, diámetros inferiores a una micra. En una realización particular, las vesículas tienen un diámetro medio inferior a 800 nanómetros, más particularmente inferior a 500 nanómetros, más particularmente inferior a 400 nanómetros. Diámetros medios de las vesículas de la invención se encuentran entre los 10 y los 350 nanómetros, típicamente entre los 100 los 300, más típicamente entre los 150 y los 250 nanómetros. Sorprendentemente, este diámetro medio se mantiene tras la liofilización y rehidratación, en caso de ser necesarias.

Como ya se ha comentado, las vesículas de la invención son útiles en el campo de la farmacología, por ejemplo, como sistemas de liberación controlada de sustancias biológicamente activas, tales como drogas o fármacos.

La eficacia de muchos fármacos puede mejorar utilizando sistemas de liberación apropiados como las vesículas. Esto puede deberse a una reducción en la toxicidad para una misma dosis y/o a una mayor eficacia *per se*. Existen muchas formas de asociación o encapsulación de los fármacos en vesículas. Por ejemplo, el fármaco puede quedar adherido a la membrana de la vesícula por atracción electrostática o fuerzas hidrofóbicas, puede quedar intercalado entre las dos capas, o disuelto dentro de vesícula. Dado que las vesículas son termodinámicamente inestables, con el tiempo se rompen liberando el fármaco (Lasic, D. D. *Liposomes: From Physics to Applications*; Elsevier: Amsterdam, 1993).

Las vesículas también son atractivas para la conversión fotoquímica de energía solar dado que pueden acomodar gran cantidad de moléculas huésped, y después separar en el espacio los fotoproductos, esencial en el almacenamiento y conversión de energía. Se ha demostrado vesículas la transferencia de energía y electrones, así como la separación de carga ((a) Nomura, T.; Escabi-Perez, J. R.; Sunamoto, J.; Fendler, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102(5), 1484-1488; (b) Janos H. Fendler, *Acc. Chem. Res.* **1980**, 13, 7-13).

### Ejemplos

#### 10 Ejemplo 1

##### *Preparación de las vesículas de la invención, liofilización y rehidratación*

Las vesículas se han preparado dispersando bromuro de tetradeciltrimetilamonio y un calixareno (*p*-sulfonatocalix [4]fenol, *p*-sulfonatocalix[6]fenol o *p*-sulfonatocalix[8]fenol) en 40 mL de agua a 60°C. Después la disolución se ha sonificado utilizando un sonificador Branson 450 con una sonda que contiene una punta plana de 13 mm. La punta se sumergió aproximadamente dos tercios de muestra y se accionó el sonificador a una potencia del 20%. Después de cada 5 min de sonicación, la muestra se dejó reposar 2 min. El tiempo de sonicación total fue siempre de 30 min. Después de equilibrar las muestras a temperatura ambiente, se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar posibles partículas de titanio.

Para la liofilización se enfrió la solución con nitrógeno, causando la nucleación y crecimiento de cristales de hielo. La sublimación posterior proporcionó las vesículas en forma de polvo.

25 La posterior rehidratación de dicho polvo proporcionó las vesículas sin necesidad de sonicación.

#### Ejemplo 2

##### *Tamaño medio de las vesículas antes y después de la liofilización y rehidratación*

El diámetro medio de las vesículas de la invención se ha medido tras su preparación por Dynamic Light Scattering (DLS) realizando los experimentos sobre un rango de dispersión de 10-150° a 25°C en un Zetasizer nano zs, siguiendo las indicaciones del fabricante. La distribución de tamaños también ha sido investigada por microscopía de transmisión electrónica (TEM), obteniéndose resultados concordantes con los obtenidos por DLS y también muestra que las vesículas generalmente son regulares y esféricas. El diámetro promedio ha sido de 180 $\pm$ 30 nm.

Después de la liofilización de la muestra se obtiene un polvo blanco y cuando se redispersa completamente en agua genera vesículas espontáneamente sin necesidad de sonicación. Asimismo se ha constatado que este proceso no cambia significativamente el tamaño de la vesícula. Para confirmar este hecho se ha medido de nuevo el radio hidrodinámico (RH) de la vesícula rehidratada observando que la distribución de tamaños de las vesículas no cambia significativamente. Asimismo confirmamos por TEM que la forma de las vesículas se mantiene intacta. También se ha observado que las vesículas no forman fases lamelares termodinámicamente más estables, como ocurre con otras vesículas del estado de la técnica, y su dispersión no requiere por lo tanto aportación adicional de energía.

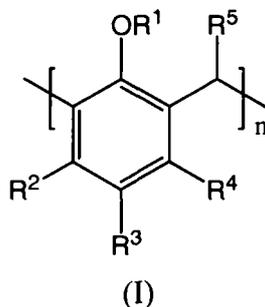
#### Ejemplo 3

##### *Preparación de las vesículas de la invención estables sin necesidad de liofilización*

50 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el ejemplo 1 se prepararon vesículas a partir de *p*-sulfonatocalix [4]fenol, *p*-sulfonatocalix[6]fenol o *p*-sulfonatocalix[8]fenol, y de sus correspondientes derivados metoxilados, utilizando 1,12-bis(trimetilamonio)dodecano. Las vesículas obtenidas resultaron estables después de, al menos, tres semanas.

## REIVINDICACIONES

1. Una vesícula **caracterizada** porque comprende uno o más surfactantes y uno o más calixarenos de fórmula (I)



en donde

20  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_3$ , alquenilo  $C_2-C_3$ , y alquinilo  $C_2-C_3$ ;

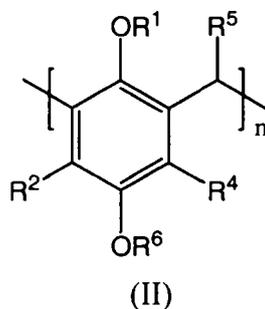
$R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, sulfonato, alquilo  $C_1-C_{20}$ , alquenilo  $C_2-C_{20}$ , alquinilo  $C_2-C_{20}$  y  $OR^6$ ;

25 en donde  $R^6$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_3$ , alquenilo  $C_2-C_3$ , alquinilo  $C_2-C_3$ ;

$R^5$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_2-C_6$ , y alquinilo  $C_2-C_6$ ; y

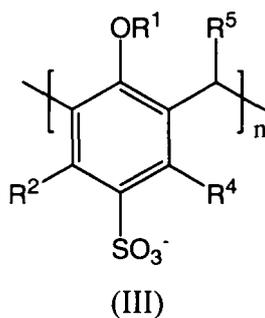
30  $n$  es un número entero que se selecciona del grupo que consiste en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

2. La vesícula según la reivindicación 1, en donde el calixareno es un calixareno de fórmula (II)



en donde  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $n$  son tal y como se han definido en la reivindicación 1.

3. La vesícula según la reivindicación 1 ó 2, en donde el calixareno es un calixareno de fórmula (III)



65 en donde  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $n$  son tal y como se han definido en la reivindicación 1, y  $R^1$  es hidrógeno o metilo.

4. La vesícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde n es 4, 5, 6, 7 u 8.

5 5. La vesícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el calixareno se selecciona del grupo que consiste en *p*-sulfonatocalix[4]fenol, *p*-sulfonatocalix[6]fenol, *p*-sulfonatocalix[8]fenol, *p*-metoxicalix[4]bencenosulfonato, *p*-metoxicalix[6]bencenosulfonato, y *p*-metoxicalix[8]bencenosulfonato.

6. La vesícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el calixareno es soluble en agua.

10 7. La vesícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el surfactante es un tetraalquilamonio de fórmula  $R^7[R^8][R^9][R^{10}]N^+A^-$ , en donde cada  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  se selecciona independientemente del grupo de los alquilos  $C_1-C_{30}$ , y  $A^-$  es un contra-anión.

15 8. La vesícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el surfactante comprende dos o más cabezas iónicas.

9. La vesícula según la reivindicación 8, en donde el surfactante es un alquiliden-di[trialquilamonio] de fórmula  $A^-N^+[R^8][R^9][R^{10}]-R^{11}-[R^8][R^9][R^{10}]N^+A^-$ , en donde cada  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  se selecciona independientemente del grupo de los alquilos  $C_1-C_{30}$ ,  $A^-$  es un contra-anión, y  $R^{11}$  es un grupo alquiliden  $C_1-C_{30}$ .

20 10. La vesícula según la reivindicación 9, en donde el surfactante es un alquiliden-di [trialquilamonio] de fórmula  $A^-N^+[R^8][R^9][R^{10}]-(CH_2)_p-[R^8][R^9][R^{10}]N^+A^-$ , en donde cada  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  se selecciona independientemente del grupo de los alquilos  $C_1-C_{30}$ ,  $A^-$  es un contra-anión, y p es un número entero entre 1 y 30.

25 11. Procedimiento para preparar una vesícula, **caracterizado** porque comprende proveer en agua al menos un calixareno de fórmula (I), tal y como se define en la reivindicación 1, y al menos un surfactante, preferiblemente aplicando sonicación.

12. Una vesícula obtenible por el procedimiento definido en la reivindicación 11.

30 13. Una vesícula tal y como se define en las reivindicaciones 1-10 ó 12 liofilizada o rehidratada.

14. Una composición que comprende una vesícula tal y como se define en las reivindicaciones 1-10, 12 ó 13.

35 15. Procedimiento que comprende la liofilización de una vesícula tal y como se define en las reivindicaciones 1-10, 12 ó 13, o una composición tal y como se define en la reivindicación 14.

16. Vesícula tal y como se define en las reivindicaciones 1-10, 12 ó 13, o una composición tal y como se define en la reivindicación 14 para su uso como medicamento.

40 17. Uso de una vesícula tal y como se define en las reivindicaciones 1-10, 12 ó 13 en un proceso de liofilización.

45 18. Uso de una vesícula tal y como se define en las reivindicaciones 1-10, 12 ó 13 como sensor, sistema de liberación controlada de sustancias biológicamente activas, tales como drogas o fármacos, o en la fabricación de productos cosméticos o en sistemas de conversión de energía solar fotoquímica.

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200902194

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.11.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1293248 B1 (CENTRAL P BV) 09.04.2008, párrafos [0001],[0017],[0018],[0020],[0026],[0028],[0031],[0038]; reivindicaciones 11,15-18,21,23,24.	1,4,13-18
A	BIZE, CÉCILE et al.; Spontaneous formation of vesicles in a catanionic association involving a head and tail functionalized amino-calix[6]arene; Chem.Commun. 2010, volumen 46, páginas 586-588; ISSN 1359-7345; publicado el 17.11.2009 en <a href="http://pubs.rsc.org/doi:10.1039/B904135D">http://pubs.rsc.org/doi:10.1039/B904135D</a>	1-18
A	US 2009233941 A1 (COLEMAN et al.) 17.09.2009, reivindicaciones.	1-18
A	SHAHGALDIAN, PATRICK et al.; Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters; International Journal of Pharmaceutics, 2003, volumen 253, número 1-2, páginas 23-38; ISSN 0378-5173.	1-18

#### 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  
27.01.2011

Examinador  
N. Vera Gutiérrez

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C08G61/12** (01.01.2006)

**A61K8/11** (01.01.2006)

**A61K9/51** (01.01.2006)

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

C08G, A61K

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

INVENES, EPODOC, CAS, REGISTRY, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 3, 5-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 4, 13-18	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 3, 5-12	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 4, 13-18	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1293248 B1	09.04.2008
D02	BIZE, CÉCILE et al.; Chem.Commun. 2010, volumen 46, páginas 586-588; ISSN 1359-7345; publicado el 17.11.2009 en <a href="http://pubs.rsc.org/doi:10.1039/B904135D">http://pubs.rsc.org/doi:10.1039/B904135D</a>	17.11.2009
D03	US 2009233941 A1	17.09.2009
D04	SHAHGALDIAN, PATRICK et al.; International Journal of Pharmaceutics, 2003, volumen 253, número 1-2, páginas 23-38; ISSN 0378-5173.	2003

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a una vesícula caracterizada porque comprende uno o más surfactantes y uno o más calixarenos de fórmula (I).

El documento D01 divulga un sistema coloidal dispersable a base de calixarenos, en forma de nanopartículas. El calixareno empleado cumple las especificaciones de la fórmula (I) de la solicitud. Para la preparación de las nanopartículas se parte de una disolución orgánica de calixarenos, que se mezcla con agua o con una disolución acuosa o iónica (párrafo [0014]). En los párrafos [0026], [0028] se indica que en el proceso de obtención pueden incluirse uno o más surfactantes. Las nanopartículas obtenidas son liofilizadas posteriormente (ejemplos 6, 7). Dichas nanopartículas presentan capacidad para encapsular y transportar sustancias activas, por lo que tienen aplicación en campos muy diversos, como cosmética, medicina, agricultura e industria sanitaria (párrafos [0017], [0038]).

A la vista de D01, se considera que las reivindicaciones 1, 4, 13-18 de la solicitud no son nuevas (Artículo 6.1 L.P.).

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que revelen la existencia de vesículas que comprendan un surfactante y un calixareno acorde a las fórmulas (II) y (III) (reivindicaciones 2 y 3) ni a las reivindicaciones 5 y 6 de la solicitud. Tampoco se han encontrado documentos que divulguen vesículas de ese tipo en las que el surfactante empleado posea las características recogidas en las reivindicaciones 7-10.

Por ello, se considera que las reivindicaciones 2, 3, 5-12 de la solicitud son nuevas e implican actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).