

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 570**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61K 47/14 (2007.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 8/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012** **PCT/ES2012/070774**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013** **WO13068625**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012** **E 12847249 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020** **EP 2792350**

54 Título: **Sistemas nanoparticulares elaborados a base de ésteres de sorbitán**

30 Prioridad:

11.11.2011 ES 201131812 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio Emprendia - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela - A Coruña, ES**

72 Inventor/es:

**SANCHEZ BARREIRO, ALEJANDRO;
SEIJO REY, BEGOÑA;
KONAT ZORZI, GIOVANNI;
SANTANA CARVALHO, EDISON LUIS y
PENSADO LOPEZ, ANDREA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 859 570 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas nanoparticulares elaborados a base de ésteres de sorbitán

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a sistemas que comprenden nanopartículas capaces de encapsular sustancias. Más concretamente, se refiere a sistemas nanoparticulares que comprenden ésteres de sorbitán. También se refiere a un procedimiento de preparación de estos sistemas y a sus aplicaciones en el campo de la medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Dentro de los sistemas coloidales propuestos para el transporte de ingredientes activos que han sido descritos en literatura, destacan las micelas, micelas mixtas, emulsiones, micro y nanopartículas y liposomas que pueden estar constituidos de materias primas de distinta naturaleza y que pueden ser obtenidos mediante las más variadas técnicas de preparación. En cualquier caso, las materias primas empleadas en la elaboración de sistemas para la liberación de fármacos serán seleccionadas dependiendo de la vía de administración preferida y teniendo en cuenta su aprobación por parte de los organismos competentes.

- 15 Una materia común a algunos de estos vehículos farmacéuticos son las sustancias tensioactivas que habitualmente intervienen en los procesos de preparación de los mismos y se incorporan en pequeñas cantidades.

- 20 Sólo en algunos casos se ha conseguido emplear tensioactivos como ingredientes fundamentales de dichos vehículos farmacéuticos. Uno de estos tensioactivos son los ésteres de sorbitán, de gran interés debido a su biocompatibilidad. Los ésteres de sorbitán son frecuentemente utilizados en la industria farmacéutica. El empleo de los mismos se debe a sus propiedades como tensioactivos no iónicos lipofílicos. Precisamente por ello, el experto en la técnica sabe que dichas propiedades se manifiestan a concentraciones bajas del agente tensioactivo (Owen I. Corrigan and Anne Marie Healy, Surfactants in Pharmaceutical Products and Systems, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Vol. 14 (Swarbrick, J. And Boylan, J.C., Eds.). Concretamente, en la literatura se recoge para los ésteres de sorbitán concentraciones que no superan el 15% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Weller, P.J (Eds.), Pharmaceutical Press, Chicago, 2009).

- 25 En el contexto descrito es necesario mencionar que ha habido autores que, pese a referirse a los ésteres de sorbitán como a tensioactivos, los han empleado como componente principal en los sistemas por ellos desarrollados. Así por ejemplo, podemos citar el desarrollo de sistemas milimétricos tipo pellets o de sistemas macroscópicos tipo gel, concretamente denominados organogeles.

- 30 En el primero de los casos se describe que la máxima concentración que se ha empleado para obtener los sistemas tipo pellet ha estado comprendida entre un 50% para el sorbitán monoestearato (span 60) y el 80% para el sorbitán monooleato (span 80) (Podcizek, F., Alessi, P. And Newton, J.M., Int. J. Pharm., 361, 2008, 33-40). Pese a ello, los autores citados han podido comprobar que lejos de desarrollarse sistemas constituidos exclusivamente por dichos componentes, la máxima cantidad de éster de sorbitán que se ha conseguido incorporar en los sistemas finales no llega al 23%.

- 35 En el segundo de los casos, lo que se consigue es obtener geles macroscópicos empleando elevados porcentajes de ésteres de sorbitán (Bari, H., International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, Volume 3, Issue 1, July – August 2010; Article 001), (Murdan, Gregoriadis and Florence, International Journal of Pharmaceutics 180 (1999) 211–214) (Murdan, Gregoriadis and Florence, J Pharm Sci., Vol. 88, No. 6, June 1999).

- 40 En base a lo anteriormente expuesto, cuando pensamos en el empleo de ésteres de sorbitán y lo citamos como tensioactivo, el experto en la técnica no piensa en su empleo a una elevada proporción, ya que dicha proporción no haría posible sus propiedades como tensioactivo. Pero incluso si el experto en la técnica lo pretende considerar como componente único o incluso mayoritario de una formulación, de lo que se describe en la literatura se desprende que únicamente sistemas de tamaño superior a micrómetros pueden ser desarrollados con tal componente.

- 45 Los únicos sistemas que han podido ser desarrollados hasta la actualidad empleando los ésteres de sorbitán como principal componente son los siguientes:

A) Sistemas microparticulares, con un diámetro medio superior a un micrómetro;

- 50 B) Microemulsiones (LIU Hai-shui, LI Tie-long, JIN Zhao-hui, GONG Yan-zhang, ZHANG Yun-xia, Microemulsion with Span®/Tween as Mixed-surfactant and Synthesis of Iron Nanoparticles, The Chinese Journal of Process Engineering, DOI CNKI-ISSN: 1009-606X.0.2007-01-013) (EP1961412A1);

C) Nanosistemas vesiculares tipo reservorio (ej. liposomas o niosomas o nanocápsulas) como es el caso de los sistemas nanovesiculares descritos por Shilpa Kakkar, Indu Pal Kaur en el International Journal of Pharmaceutics, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.027.

Los liposomas son vesículas coloidales en las que una membrana de estructura bilaminar compuesta de lípidos de diferentes naturaleza, encierra o encapsula una parte de la fase acuosa en la que los propios liposomas se encuentran dispersos. La unidad básica de la estructura de los liposomas es, por tanto, la bicapa lipídica que constituye la membrana vesicular, cuya formación tiene lugar espontáneamente en presencia de agua. A esta formación espontánea se han ido incorporando niveles de sofisticación en su estructura y procedimiento de obtención, mejorando de esta forma su capacidad para actuar como sistemas de liberación de fármacos y, en la misma medida, sus posibles aplicaciones terapéuticas. La composición lipídica, el tamaño de partícula o vesícula, el número de lamelas o bicapas que forman la pared, así como la composición de las fases acuosas interna y externa o el método de preparación, determinan las características físico-químicas de las vesículas, su capacidad para la encapsulación de fármacos, y también su estabilidad y comportamiento tanto *in vivo* como *in vitro*. Los liposomas son considerados sistemas transportadores de fármacos. Sin embargo, a pesar del gran interés, existen importantes problemas, relacionados sobre todo con la estabilidad del sistema en los fluidos corporales y, en particular, en el torrente sanguíneo, en donde se produce una excesiva pérdida de fármaco y una rápida intercepción del sistema, con la consiguiente retirada del mismo de la circulación, por las células del sistema fagocítico mononuclear (MPS) Andresen et al., Progress in Lipid Research 44 (2005) 68–97. Tal constatación representa un obstáculo para los liposomas como sistemas de transporte de fármacos. Además se comprobó que, en general, los liposomas presentan una capacidad de encapsulación limitada, sobre todo frente a fármacos hidrofílicos, así como un tamaño heterogéneo, observándose con frecuencia una falta de reproducibilidad de las formulaciones elaboradas, siendo, esas características también relacionadas con los métodos de preparación de los mismos Lian y Ho, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 90, NO. 6, JUNE 2001, 667-680.

Los tres tipos de sistemas anteriores presentan un grave problema en lo que respecta a su estabilidad. Los sistemas vesiculares y emulsiones son conocidos por experimentar fenómenos de agregación y la dificultad para obtener formulaciones más estables mediante procesos como la liofilización sin alterar significativamente sus características iniciales. En este sentido, no debemos olvidar que para la propia formación de tales sistemas es preciso un considerable aporte energético y/o el empleo de combinaciones específicas de agentes tensioactivos, por lo que el producto obtenido se encuentra en una situación energéticamente desfavorable o inestable. Además, se trata de sistemas especialmente sensibles a variaciones en el entorno como la temperatura.

Por otro lado, los sistemas microparticulados poseen cierta tendencia a la sedimentación debido a la influencia de la fuerza gravitacional.

Las nanopartículas, en cuanto a que se trata de nanosistemas de tipo matricial, son sistemas adecuados para la liberación de fármacos, ya que son más estables que los citados anteriormente, en general presentan mayor capacidad de encapsulación, es posible prepararlas con un tamaño homogéneo.

Sin embargo, no es posible preparar nanopartículas en base a ésteres de sorbitán siguiendo las enseñanzas del estado de la técnica, considerando como más próximo las nanopartículas constituidas por componentes lipofílicos como las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (Rainer H. Muëller, Karsten Maëder, Sven Gohla, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (2000) 161±177), (S.A. Wissinga, O. Kayserb, R.H. Müller, Advanced Drug Delivery Reviews 56 (2004) 1257– 1272).

Uno de los métodos para preparar nanopartículas empleando excipientes de baja hidrosolubilidad como los poliésteres, es el conocido como emulsificación-evaporación, recogido por ejemplo en el artículo científico de Gref y col., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51, 2001, 111-118. Cuando se sigue el método descrito en el punto 2.2 de la página 112, empleando como único componente en la fase orgánica ésteres de sorbitán, no se obtienen nanopartículas sino un agregado (ver ejemplo 1A de la presente memoria).

Asimismo, al tratar de emplear otra técnica como la de nanoprecipitación (Paolicelli y col., Nanomedicine, 5, 2010, 843-853), frecuente en el desarrollo de nanopartículas lipídicas, nuevamente se puede confirmar que una técnica con la que es posible obtener con facilidad nanopartículas basadas en componentes de baja hidrosolubilidad resulta ineficaz para el desarrollo de nanopartículas con cualquier contenido porcentual en masa de un éster de sorbitán (ver ejemplo 1B de la presente memoria).

Lee et al. describe nanogeles que contienen ácido hialurónico y Span (Lee et al., J. Control. Rel. 119, 2007, 245-252).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado nanopartículas constituidas principalmente por ésteres de sorbitán, que son estables y adecuadas para la liberación de fármacos. En la presente invención se emplean ésteres de sorbitán no como un tensioactivo reconocido por su seguridad o, como se dice técnicamente por la FDA y en la industria farmacéutica, "Generally Recognized As Safe" (GRAS) destinado a posibilitar la obtención de una forma farmacéutica, sino únicamente como un material lipofílico GRAS constitutivo de la misma. De hecho, la presente invención proporciona nanopartículas constituidas exclusivamente por ésteres de sorbitán que, por consiguiente, es un componente básico, a diferencia de las enseñanzas del estado de la técnica en la que se emplea como excipiente que facilita la obtención de nanopartículas constituidas mayoritariamente por otros componentes.

Además es posible la incorporación de diversos componentes adicionales. Estos componentes adicionales permiten modular las características del sistema confiriéndole una gran versatilidad en términos de características físico-químicas y de interacción con otros componentes, y facilitan la incorporación de ingredientes activos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.

- 5 La estructura interna del sistema de liberación de fármacos de la presente invención, no es un espacio interno acuoso rodeado por una bicapa lipídica ni está basada en nanoemulsiones sino que se trata de una estructura matricial nanoparticular homogénea.

- Además, la invención proporciona un procedimiento de preparación de dicho sistema nanoparticular que se caracteriza por la formación espontánea que transcurre en una única etapa mediante una sencilla técnica que no requiere el empleo de inyección u homogeneización, en donde las nanopartículas que constituyen dicho sistema nanoparticular comprenden al menos un éster de sorbitán como componente principal de las nanopartículas. Los disolventes empleados no son tóxicos y además las condiciones en las que se prepara el sistema de la presente invención son suaves de manera que es posible incorporar material genético o proteínas sin riesgo a su degradación y/o pérdida de su actividad biológica.
- 10

- 15 Una ventaja asociada al sistema de la invención es que resulta adecuado como promotor de la penetración a través de superficies mucosas y piel y como promotor de la absorción de diferentes ingredientes activos.

Así, en un aspecto la invención se dirige a nanopartículas que comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%.

- Adicionalmente, la nanopartícula de la invención también puede comprender de manera opcional otros componentes como por ejemplo una sustancia catiónica, una sustancia aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos.
- 20

Adicionalmente, la nanopartícula de la invención también puede comprender un ingrediente activo.

- Adicionalmente, la nanopartícula de la invención puede comprender un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos.
- 25

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas descritas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición cosmética que comprende las nanopartículas descritas anteriormente.

- 30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición nutricional que comprende las nanopartículas descritas anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto sanitario que comprende las nanopartículas descritas anteriormente.

- 35 En otro aspecto, la invención se refiere a una sustancia para el recubrimiento de superficies que comprende las nanopartículas descritas anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de las nanopartículas descritas anteriormente en la preparación de un medicamento. Dicho medicamento puede ser empleado junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Así, en una realización particular, la invención se refiere al uso de las nanopartículas descritas anteriormente para preparar un medicamento para terapia combinada.

- 40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las nanopartículas descritas anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una fase orgánica que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%;
- b) mezclar bajo agitación la disolución obtenida en a) con una disolución acuosa.

- 45 Un último aspecto de la invención se dirige a nanopartículas obtenibles como se describió anteriormente.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Fotografía de las nanopartículas elaboradas empleando PLGA:éster de sorbitán en una relación de 39:1 (izquierda) y del agregado obtenido cuando se emplea exclusivamente el éster de sorbitán (derecha), según se describe en el ejemplo 1.

Figura 2. Morfología de las nanopartículas preparadas con Span® 80 y OA (A y B), Span® 80 y CTAB (C) o Span® 80 y BZC (D), observadas mediante microscopía electrónica de transmisión a diferentes aumentos.

Figura 3. Morfología de las nanopartículas asociando siRNA preparadas empleando Span® 80 y OA (A) o Span® 80 y BZC (B), observadas mediante microscopía electrónica de transmisión a diferentes aumentos.

- 5 Figura 4. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (100V durante 30min). (A) siRNA-GAPDH libre 0,05 mg/mL; (B) NP80OA asociando siRNA-GAPDH 0,15 mg/mL (C); NP80OA asociando siRNA-GAPDH 0,10 mg/mL (D); NP80OA asociando siRNA-GAPDH 0,05 mg/mL; (E) NP80CTAB asociando siRNA-GAPDH 0,15 mg/mL; (F) NP80CTAB asociando siRNA-GAPDH 0,10 mg/mL; (G) NP80CTAB asociando siRNA-GAPDH 0,05 mg/mL; (H) NP80OA blancas (sin siRNA) (I) NP 80CTAB blancas (sin siRNA) (NP80OA, NP80CTAB: nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y con su carga superficial modulada con OA o CTAB, respectivamente).
- 10

Figura 5. Morfología de las nanopartículas preparadas con Span® 20 y OA, observadas mediante microscopía electrónica de transmisión a diferentes aumentos.

Figura 6. Morfología de las nanopartículas preparadas con Span® 20 y OA asociando siRNA, observadas mediante microscopía electrónica de transmisión a diferentes aumentos.

- 15 Figura 7. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (100V durante 30min). (A) NP20OA asociando siRNA-GAPDH 0,10 mg/mL, (B); NP20OA asociando siRNA-GAPDH 0,05 mg/mL (NPOA: nanopartículas elaboradas a base de Span® 20 y con su carga superficial modulada con OA).

Figura 8. Tamaño medio de partícula de las formulaciones preparadas con Span® 80 a tiempo cero (recién preparadas), treinta y sesenta días después de su almacenamiento en nevera a 4°C (n=3).

- 20 Figura 9. Potencial zeta de las formulaciones preparadas con Span® 80 a tiempo cero (recién preparadas), treinta y sesenta días después de su almacenamiento en nevera a 4°C (n=3).

Figura 10. Tamaño medio de partícula de las formulaciones preparadas con Span® 20 a tiempo cero (recién preparadas), treinta y sesenta días después de su almacenamiento en nevera a 4°C (n=3).

- 25 Figura 11. Potencial zeta de las formulaciones preparadas con Span® 20 a tiempo cero (recién preparadas), treinta y sesenta días después de su almacenamiento en nevera a 4°C (n=3).

Figura 12. Aspecto de los sistemas nanoparticulares tras la liofilización con trealosa al 5% (A) y aspecto del polvo liofilizado en detalle (B).

Figura 13. Morfología de las nanopartículas asociando plásmido modelo (pEGFP) preparadas empleando Span® 80 y OA (NP80OA-pADN) observadas mediante microscopía electrónica de transmisión a diferentes aumentos.

- 30 Figura 14. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (100V durante 30min). (A) pEGFP libre 0,15 mg/mL; (B) NP80OA-pEGFP 0,15 mg/mL; (C) NP80OA-pEGFP 0,2 mg/mL; (D) NP80OA-pEGFP 0,25 mg/mL; (E) NP80OA-pEGFP 0,3 mg/mL; (F) NP80OA-pEGFP 0,4 mg/mL; (G) NP80OA-pEGFP 0,5 mg/mL. (NP80OA-pEGFP: nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y con su carga superficial modulada con OA asociando ADN plasmídico pEGFP a una relación 1:1).

- 35 Figura 15. Expresión celular positiva de proteína verde fluorescente a las 48 post-transfección con nanopartículas NP80OA-pEGFP a diferentes concentraciones finales de plásmido por pocillo. (A) 1 microg pEGFP, (B) 2 microg pEGFP, (C) 3 microg pEGFP, (D) 4 microg pEGFP.

- 40 Figura 16. Expresión celular positiva de proteína verde fluorescente a las 72 post-transfección con nanopartículas NP80OA-pEGFP a diferentes concentraciones finales de plásmido por pocillo. (A) 1 microg pEGFP, (B) 2 microg pEGFP, (C) 3 microg pEGFP, (D) 4 microg pEGFP.

Figura 17. Espectro monodimensional de protón (¹H-RMN) de las nanopartículas de Span® 80 (NP80) (imagen superior) y las nanopartículas de Span® 80 incorporando oleilamina (NP80OA) (imagen inferior).

Figura 18. Espectro monodimensional de protón (¹H-RMN) de la molécula de Span® 80 (imagen superior) y de la molécula de oleilamina (OA) (imagen inferior).

- 45 Figura 19. Espectro 1H Dfilter para las formulaciones NP80 (imagen superior) y NP80OA (imagen inferior). Se utilizó la secuencia de eco estimulado con Δ=350 ms, δ= 1 ms y gradiente de 65 G cm⁻¹.

Figura 20. Espectro 1D STD (diferencia STDoff- STDOn) con saturación selectiva a 0.12 ppm para las formulaciones NP80 (imagen superior) y NP80OA (imagen inferior).

- 50 Figura 21. Espectro 1D STD (diferencia STDoff- STDOn) con saturación selectiva a 5.55 ppm para las formulaciones NP80 (imagen superior) y NP80OA (imagen inferior).

Figura 22. Modelo de nanopartícula esférica con un gradiente de flexibilidad molecular desde el interior ("core" rígido) hacia el exterior (flexible).

Figura 23. Espectro Waterlogsy mostrando las señales para las formulaciones NP80 (imagen superior) y NP80OA (imagen inferior).

- 5 Figura 24. Morfología de las nanopartículas liofilizadas preparadas empleando Span® 80 y OA (NP80OA) observadas mediante microscopía electrónica de transmisión a diferentes aumentos.

Figura 25. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (100V durante 30min). Para las nanopartículas liofilizadas asociando ADN plasmídico elaboradas empleando Span® 80 y OA (NP80OA-pEGFP 0,2 mg/ml), almacenadas durante 3 meses y posteriormente resuspendidas. (A) pEGFP libre 0,2 mg/mL; (B, C, D) NP80OA-pEGFP almacenadas a temperatura ambiente (TA); (E,F,G) NP80OA-pEGFP almacenadas a 37°C; (H,I,J) NP80OA-pEGFP almacenadas a 4°C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se dirige a nanopartículas, como se describieron previamente, adecuadas para la encapsulación de sustancias, por ejemplo, principios activos o marcadores.

- 15 En función de los componentes empleados y del procedimiento de elaboración seleccionado, estas nanopartículas permiten la vehiculización de sustancias activas de diversa naturaleza, desde moléculas hidrofílicas hasta fármacos muy hidrofóbicos. La sustancia encapsulada en las nanopartículas está disuelta, atrapada y/o adsorbida en el seno de la estructura coloidal.

20 En la presente invención, por el término "nanopartículas" se entiende que son materiales coloidales sólidos, cuyo tamaño medio oscila entre 1 y 999 nm, que poseen una estructura bajo la forma de matriz sólida; además se caracterizan por ser estructuras estables y de características homogéneas, reproducibles y modulables perfectamente.

25 Las nanopartículas de los sistemas de la invención son perfectamente diferenciables de otros sistemas coloidales por sus características estructurales, así por ejemplo, las nanopartículas de la invención no presentan las bicapas lipídicas características de los liposomas; y tampoco poseen un núcleo oleoso característicos de nanoemulsiones o nanocápsulas. Las nanopartículas de la invención no comprenden aceites ni componentes oleosos.

30 En una realización particular, la invención se dirige a nanopartículas que comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%, caracterizadas por ser una matriz sólida, homogénea, cuyo tamaño medio está comprendido entre 1 y 999 nm. En una realización particular, las nanopartículas comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 80% y 100%. Más preferiblemente las nanopartículas de la invención comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 90% y 100%. En una realización particular, las nanopartículas de la invención se caracterizan además por no comprender aceites ni componentes oleosos.

35 Las nanopartículas del sistema de la invención tienen un tamaño de partícula promedio de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 50 y 600 nm, incluso más preferiblemente de entre 100 y 400 nm. El tamaño promedio de las partículas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación de partículas establecidas en el procedimiento de obtención seleccionado.

40 Por el término "tamaño promedio" se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El tamaño promedio de estos sistemas puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen en la parte experimental a continuación.

La población de las nanopartículas de la invención que se mueven juntas en un medio acuoso presenta un índice de polidispersión inferior a 0.2, más preferiblemente de entre 0 y 0.1. Esto quiere decir que las partículas comprendidas en el sistema poseen una distribución de tamaños homogénea.

45 Las nanopartículas de los sistemas de la invención poseen una estructura matricial que permite incorporar componentes adicionales que aumentan y mejoran su estabilidad, como por ejemplo polímeros aniónicos y/o catiónicos y modificaciones con óxido de etileno. En una realización particular de la invención, las nanopartículas comprenden adicionalmente una sustancia catiónica, aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos, en una proporción en peso entre el 0% y 40% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula. En una realización particular, la proporción en peso de la sustancia catiónica, la sustancia aniónica, el derivado de óxido de etileno o la combinación de los mismos, está comprendida entre 0% y 20% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula; más particularmente entre 0% y 10%.

Por otra parte, las nanopartículas presentan carga eléctrica (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede ser modulada mediante una adecuada selección de la composición del sistema. Concretamente, dicha carga eléctrica puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de los componentes del sistema y la proporción

existente entre los mismos. El potencial zeta de las nanopartículas de los sistemas de la invención puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental de la presente memoria descriptiva.

- 5 En una realización particular de la invención, las nanopartículas presentan carga que varía entre -50 mV y $+60$ mV, incluso más preferiblemente entre -40 mV y $+50$ mV, dependiendo de la proporción de los componentes.

Por otro lado, la posibilidad que ofrece la presente invención de modular la carga eléctrica de las nanopartículas presenta grandes ventajas. Así, una carga negativa es particularmente adecuada para garantizar la estabilidad de las nanopartículas tras la administración por vía parenteral. En una realización particular, la invención se refiere a las nanopartículas anteriormente descritas caracterizadas por presentar una carga comprendida entre -50 mV y -20 mV.

- 10 Y, la carga positiva resulta especialmente adecuada para mejorar la interacción con las mucosas (que generalmente presentan una carga negativa). Es posible modular la carga de las nanopartículas de la invención para que presenten carga positiva, por ejemplo y sin limitarse a estos casos, cuando comprenden además una sustancia catiónica en una proporción que no supera el 40% en peso en relación al peso total de los componentes del sistema. Y así, en una realización particular, la invención se refiere a las nanopartículas anteriormente descritas
15 caracterizadas por presentar una carga comprendida entre $+55$ mV y $+20$ mV.

Componentes del sistema

Ésteres de sorbitán

El sorbitán está constituido por una mezcla de anhídridos cíclicos del sorbitol, como por ejemplo y sin que se limite a estos, el 1,4-anhidrosorbitol, 1,5-anhidrosorbitol y 1,4,3,6-dianhidrosorbitol.

- 20 Se entiende por “ésteres de sorbitán” los derivados esterificados del sorbitán donde los grupos éster poseen un sustituyente seleccionado de entre alquilo, alquenilo y alquinilo. Los ésteres de sorbitán incluyen derivados en los que uno, dos, tres o cuatro grupos hidroxilo están esterificados, e incluso incluyen derivados esterificados en los que una molécula de éster está presente por cada dos moléculas de sorbitán (en cuyo caso se nombran con el prefijo “sesqui-”). Así, por ejemplo, el monooleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultado de la esterificación de un
25 grupo hidroxilo con el ácido oleico; el trioleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultante de la esterificación de tres grupos hidroxilo del sorbitán con el ácido oleico.

- Se entiende por “alquilo” una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que no contiene ninguna insaturación, de 1 a 24 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-SR^b$, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$; donde R^a y R^b se
30 seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, alquenilo y alquinilo.

“Alquenilo” y “alquinilo” en los compuestos de la presente invención se refieren a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene al menos una insaturación, de 2 a 24 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-SR^b$, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

- 35 En una realización preferida el alquilo, alquenilo y alquinilo poseen una cadena de entre 6 y 24 átomos de carbono, más preferiblemente de entre 10 y 16 átomos de carbono.

- En una realización particular, el éster de sorbitán se selecciona de entre el grupo consistente en mono-, di-, tri- o sesqui-oleato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-laurato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-palmitato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-estearato de sorbitán y mono-, di-, tri- o sesqui-isoestearato de sorbitán, y sus
40 combinaciones.

Los ésteres de sorbitán son tensioactivos no iónicos debido a que contienen dos regiones localizadas, una de naturaleza hidrófila y otra hidrófoba. Estos tensioactivos no iónicos tienen la ventaja de ser menos irritantes que los tensioactivos aniónicos o catiónicos. Además son generalmente compatibles con sustancias tanto aniónicas como catiónicas, puesto que no se ionizan en solución.

- 45 **Componentes opcionales**

En una realización particular, los sistemas de la invención comprenden además una sustancia catiónica.

La sustancia catiónica permite modular las características de los sistemas nanoparticulares, como por ejemplo, el tamaño de partícula, la carga eléctrica superficial y la composición y dotarlas así de una mayor versatilidad.

- 50 En el contexto de la presente invención, se entiende por “sustancia catiónica” aquella molécula dotada de carga eléctrica positiva, por ejemplo sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas o lipofílicas.

En una realización particular, el polímero catiónico se selecciona entre protamina, poliglutámico, dextrano cationizado, poliaminoácidos y proteínas cationizadas, y sus sales.

El término "cationizado" hace referencia a la presencia de un grupo con carga positiva, que puede estar presente de forma natural o puede ser introducido mediante una reacción química.

En una realización particular, los poliaminoácidos se seleccionan de entre polilisina y poliarginina. En otra realización particular, las proteínas cationizadas se seleccionan de entre gelatina, albúmina, colágeno y atelocolágeno, y sus derivados cationizados.

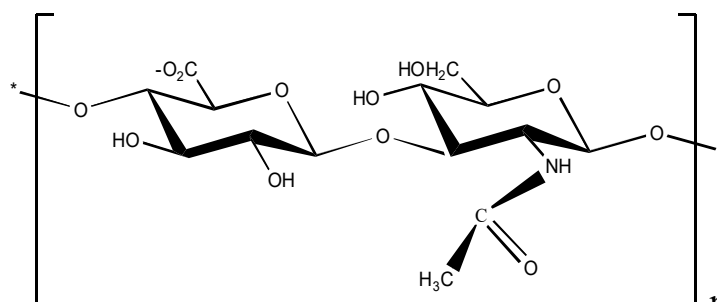
En una realización particular, las sales de amonio se seleccionan entre bromuro de cetil trimetil amonio y cloruro de benzalconio. En otra realización particular, la amina grasa es oleilamina (*cis*-1-amino-9-octadecene).

En una realización particular, los sistemas de la invención pueden comprender además una sustancia aniónica. De forma preferida, la sustancia aniónica es un polímero aniónico.

Por el término "polímero aniónico" se entiende cualquier polímero con una carga neta negativa, incluyendo en dicha definición aquellos polímeros aniónicos sobre los que se han efectuado modificaciones tales como fragmentación enzimática o química o derivatización.

El polímero aniónico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido hialurónico, ácido colomínico, polisialico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furcelaranos, alginatos, agar agar, glucomanano, goma gelano, goma garrofín, goma guar, goma tragacanto, goma arábica, goma xantano, goma karaya, pectinas, celulosas, almidones, sus sales, fragmentos, derivados o combinaciones de los mismos.

El hialuronano es un polímero lineal que comprende la repetición de una estructura de disacárido formada por la adición alterna de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos alternando enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glucosídicos tal como se muestra en la siguiente fórmula:

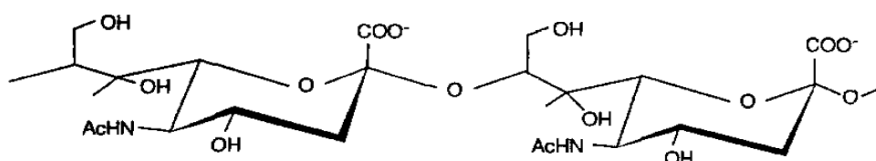


en la que el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacárido en la cadena de hialuronano.

En el contexto de la presente invención, se puede emplear ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos moleculares. El ácido hialurónico de elevado peso molecular está comercialmente disponible, mientras que el de peso molecular inferior puede obtenerse mediante la fragmentación del ácido hialurónico de elevado peso molecular, utilizando, por ejemplo, una enzima hialuronidasa.

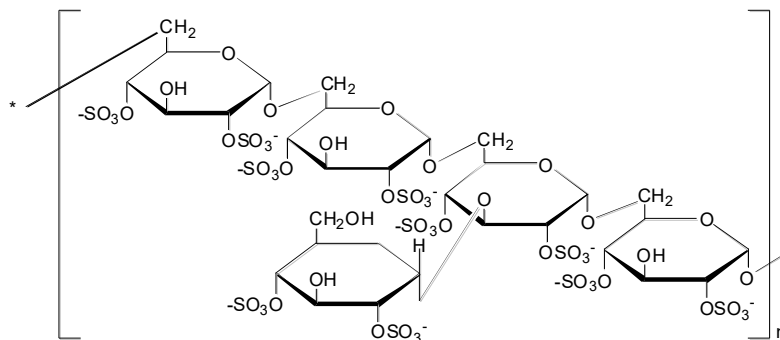
El término "hialurónico, ácido hialurónico, hialuronano" tal como se utiliza en la presente descripción incluye o bien el ácido hialurónico o bien una base conjugada del mismo (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina del ácido hialurónico que incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, sales orgánicas tales como sales de aminoácidos básicos a pH neutro, preferiblemente dichas sales son farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la invención, la sal alcalina es la sal de sodio del ácido hialurónico.

La familia de los ácidos polisialicos, término que incluye al ácido colomínico, se encuentra integrada por polímeros lineales constituidos por residuos de ácido N-acetilneuraminico (Neu5Ac; también conocido como ácido siálico), un constituyente natural de células y tejidos, unidos por enlaces glicosídicos α -(2 $\rightarrow$ 8). Cada residuo de ácido N-acetilneuraminico posee un grupo carboxilo, responsable de la carga negativa del ácido colomínico, tal y como se muestra en la siguiente fórmula:



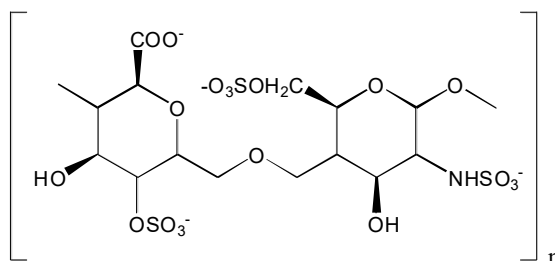
Se trata de un material de indudable interés en el campo farmacéutico y cosmético, por ser biocompatible y biodegradable, no inmunogénico, cuyos productos de degradación no son tóxicos (Gregoriadis G et al. Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57, 1964–1969). Por otro lado, los ácidos polisulfónicos están caracterizados por tener, entre otras propiedades, una semivida plasmática muy larga, por lo que han sido propuestos como alternativa a los derivados de polietilenglicol para prolongar el tiempo de permanencia en el plasma de fármacos y sistemas de liberación de ingredientes activos, como los liposomas. De hecho, en la patente “WO/2008/033253 – Liposome complexes containing pharmaceutical agents and methods” se recurre a su empleo para modificar en superficie liposomas preformados. Por último, teniendo en cuenta sus características estructurales, este material ofrece la posibilidad de su modificación, por ejemplo de la introducción de grupos amino y consiguiente cationización.

- 10 El sulfato de dextrano es un glucano (polisacárido) complejo constituido por unidades de moléculas de glucosa, cada una de las cuales contiene aproximadamente dos grupos sulfato tal como se muestra en la siguiente fórmula:



- 15 El sulfato de dextrano se prepara mediante sulfatación de dextrano y posterior purificación mediante procedimientos de sobra conocidos por un experto en la materia.

La heparina es una sustancia de origen natural de la familia de los glicosaminoglicanos cuya estructura química comprende la repetición de unidades monoméricas disacáridas de ácido 2-O-sulfo- α -L-idurónico y 2-deoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranosil-6-O-sulfato, representada a continuación:



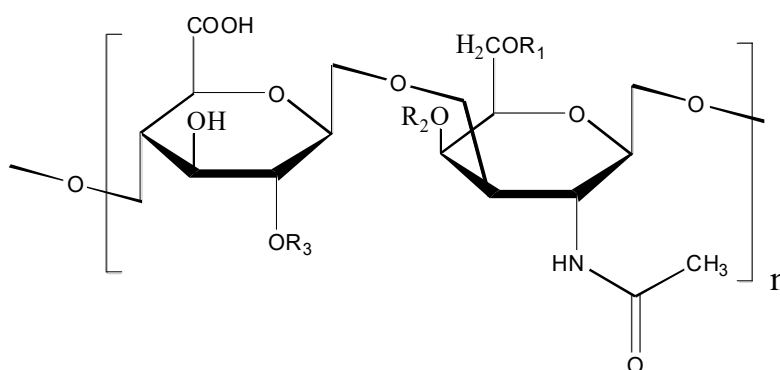
- 20 donde n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de heparina.

En el contexto de la presente invención, es posible emplear tanto la heparina fraccionada como la no fraccionada. La heparina tradicional o no fraccionada se distingue claramente de la heparina fraccionada o de bajo peso molecular. La primera de ellas es una sustancia natural presente en todos los vertebrados. Ambos tipos de heparina se pueden utilizar en forma de base libre o en forma de sal, como por ejemplo su sal sódica o cálcica.

- 25 La heparina fraccionada o de bajo peso molecular se produce por despolimerización química o enzimática de heparinas convencionales. Ejemplos de este tipo de heparinas son enoxaparina, parnaparina, dalteparina y nadroparina, así como sus sales tales como las sales de sodio y calcio.

- 30 Los derivados de heparina también pueden ser empleados en la composición de los sistemas nanoparticulares de la presente invención. Estos derivados son conocidos en el estado de la técnica y se originan como consecuencia de la reactividad de los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. Así, heparinas N-acetiladas, O-descarboxiladas, oxidadas o reducidas son ampliamente conocidas.

- 35 El sulfato de condroitina es un glucosaminoglucano (GAG) sulfatado compuesto por una cadena de azúcares alternados. Se encuentra normalmente unido a proteínas como parte de un proteoglicano. Se representa mediante la siguiente estructura:



en la que n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacáridos en la cadena de sulfato de condroitina y en la que R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo SO_3H . Cada monosacárido puede dejarse sin sulfatar, sulfatarse una vez, o sulfatarse dos veces. La sulfatación está mediada por sulfotransferasas específicas.

En el contexto de la presente invención, el término “sulfato de condroitina” incluye todos sus diferentes isómeros y derivados, así como combinaciones de los mismos.

En una realización particular, el sulfato de condroitina se selecciona entre las siguientes sustancias y combinaciones de las mismas:

- sulfato de condroitina A que está sulfatado predominantemente en el carbono 4 del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) y que también se conoce como sulfato de 4-condroitina ($R_1=\text{H}$, $R_2=\text{SO}_3\text{H}$ y $R_3=\text{H}$)
- sulfato de condroitina B que se denomina también sulfato de dermatano. Esta sustancia está compuesta por unidades de repetición lineales que contienen N-acetilgalactosamina y o bien ácido L-idurónico o bien ácido glucurónico, y cada disacárido puede estar sulfatado una vez o sulfatado dos veces. Está presente mayoritariamente en la piel, pero también se encuentra en vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendones y pulmones.
- sulfato de condroitina C que está sulfatado predominantemente en el carbono 6 del azúcar GalNAc y que se conoce también como sulfato de 6-condroitina ($R_1=\text{SO}_3\text{H}$, $R_2=\text{H}$ y $R_3=\text{H}$);
- sulfato de condroitina D que está sulfatado predominantemente en el carbono 2 del ácido glucurónico y en el carbono 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina ($R_1=\text{SO}_3\text{H}$, $R_2=\text{H}$ y $R_3=\text{SO}_3\text{H}$);
- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 4,6-condroitina ($R_1=\text{SO}_3\text{H}$, $R_2=\text{SO}_3\text{H}$ y $R_3=\text{H}$);

El término “sulfato de condroitina” también incluye sales orgánicas e inorgánicas del mismo. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, mediante reacción de la forma básica de este compuesto con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales inorgánicas incluyen, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y las sales orgánicas incluyen, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilo-etanolamina, trietanolamina, glucamina y aminoácidos básicos. Preferiblemente las sales son farmacéuticamente aceptables.

Las funciones de la condroitina dependen en buena parte de las propiedades del proteoglucano global del que es una parte. Estas funciones pueden dividirse de forma amplia en papeles reguladores y estructurales. Sin embargo, esta división no es absoluta y algunos proteoglucanos pueden desempeñar papeles tanto estructurales como reguladores.

Con respecto a su papel estructural, el sulfato de condroitina es un componente principal de la matriz extracelular, y es importante para mantener la integridad estructural del tejido. Como una parte de un agregado, el sulfato de condroitina es un componente principal del cartílago. Los grupos sulfato sumamente cargados y de empaquetamiento compacto del sulfato de condroitina generan repulsiones electrostáticas que proporcionan mucha de la resistencia del cartílago a la compresión.

El sulfato de queratano es un glucosaminoglicano sulfatado similar al sulfato de condroitina en el que el grupo sulfato se encuentra en el glucurónico. Concretamente, se encuentra constituido por galactosa y GlcNAc-6-sulfato, unidos mediante un enlace β -1,4.

Se encuentra principalmente en córnea, cartílago y hueso. A nivel de las articulaciones ayuda a absorber impactos mecánicos, disminuyendo los efectos de éstos sobre estructuras circundantes. Participa en el desarrollo del sistema nervioso central y en los mecanismos de protección que se activan cuando en éste se produce un daño.

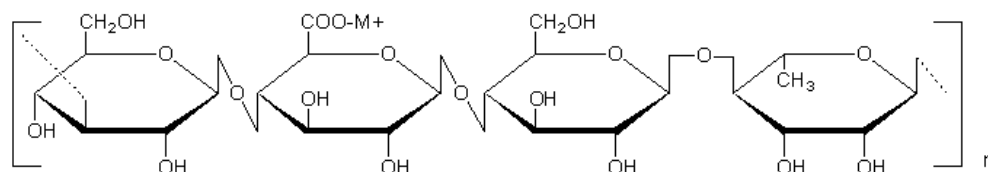
El carragenano está formada por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no-sulfatadas, unidas por enlaces alternos α -1,3 y α -1,4. Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de grupos de anhidrogalactosa se distinguen varios tipos de carragenano, con propiedades como hidrocoloides claramente distintas. A mayor proporción de grupos sulfato, la solubilidad es mayor, y a mayor proporción de grupos de anhidrogalactosa la solubilidad es menor. En el contexto de la presente invención, están incluidos todos los tipos de carrageno. Algunos de estos incluyen por ejemplo los carragenanos kappa, iota y lambda (k, i y l).

El glucomanano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica lineal con una pequeña proporción de ramificaciones. En concreto, está formado por unidades de D-manosa y D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 en una proporción de 1.6:1, respectivamente.

En una realización particular de la invención, el glucomanano empleado es un derivado de glucomanano con carga negativa seleccionado entre los derivados fosforilados, carboximetil y dicarboxi-glucomananos.

La goma gelano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica formada por unidades de α -L-ramnosio, β -D-ácido glucurónico y dos unidades de β -D-glucosa.

Se representa mediante la siguiente estructura:



donde n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de goma gelano. El polímero puede encontrarse en forma parcialmente acetilada. Dependiendo de su grado de acetilación, la goma gelano proporciona geles con propiedades mecánicas distintas.

En el contexto de la presente invención, el término "goma gelano" incluye todos sus diferentes derivados, así como combinaciones de los mismos.

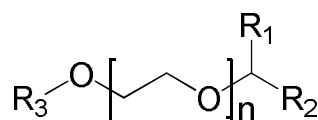
En una realización particular, las nanopartículas de la invención como se han descrito anteriormente comprenden además:

- i) una sustancia catiónica seleccionada del grupo constituido por sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas, y/o
- ii) un polímero aniónico seleccionado de entre el grupo constituido por ácido hialurónico, ácido colomínico, polisialico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furcelaranos, alginatos, agar-agar, glucomanano, goma gelano, goma de algarrobo, goma de guar, goma de tragacanto, goma arábica, goma de xantano, goma de karaya, pectinas, celulosas, almidones, sus sales, fragmentos, derivados o combinaciones de los mismos

Las nanopartículas pueden comprender opcionalmente un derivado de óxido de etileno.

Para los fines de la presente invención, se entiende por "derivado de óxido de etileno" un compuesto en el que se repite una unidad $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$.

En una realización particular, el derivado de óxido de etileno es un compuesto de fórmula I



donde R_1 es un grupo carbonilo o hidrógeno; R_2 es un grupo alquilo, alqueno o alquino, de entre 2 a 24 átomos de carbono; R_3 es hidrógeno o un grupo alquilo de entre 1 a 6 átomos de carbono; n es un valor de entre 1 y 100. En una realización particular, n tiene un valor de entre 1 y 50, más preferiblemente entre 1 y 24.

- 5 Ejemplos de derivados de óxido de etileno, sin limitarse a éstos, son polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), polietilenglicol hexadecil éter (Brij 56), polietilenglicol 2-octadecil éter (Brij 72), polietilenglicol 8-octadecil éter (Brij 78), polietilenglicol 8-estearato (Myrj 45), 2-hidroxietil octadecanoato (Myrj 52), monoestearato de etilen glicol, monoestearato de trietilen glicol.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención están caracterizadas por ser una matriz sólida homogénea, cuyo tamaño medio está comprendido entre 1 y 999 nm y están constituidas por

- 10 a) uno o más ésteres de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%, y
b) un componente seleccionado de entre el grupo consistente en una sustancia catiónica, aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos, en una proporción en peso entre 0% y 40% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula.

- 15 En una realización más particular, las nanopartículas de la invención están caracterizadas por ser una matriz sólida homogénea, cuyo tamaño medio está comprendido entre 1 y 999 nm y consisten en uno o más ésteres de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 99% y un componente comprendido entre el grupo consistente en una sustancia catiónica, aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos, en una proporción en peso entre 40% y 1% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula.

Ingrediente activo

- 20 Las nanopartículas de la presente invención proporcionan sistemas con una elevada capacidad de asociación de ingredientes activos. En consecuencia, según otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden adicionalmente al menos un ingrediente activo.

- 25 El término "ingrediente activo" se refiere a un ingrediente o célula que se utiliza en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que se utiliza para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales, así como aquel ingrediente o célula que se destina a destruir, impedir la acción, contrarrestar o neutralizar, cualquier organismo o entidad nocivos, o bien cualquier ingrediente o célula que se utiliza como cosmético o de higiene, así como aquel ingrediente o célula que se destina a regenerar tejidos o en ingeniería de tejidos o en terapia celular.

- 30 Las nanopartículas objeto de la presente invención son adecuadas para asociar ingredientes activos independientemente de las características de solubilidad de los mismos. La capacidad de asociación dependerá del ingrediente activo correspondiente, pero en términos generales será elevada tanto para ingredientes hidrófilos, como para los de marcado carácter hidrófobo.

- 35 En una realización particular, el ingrediente activo se selecciona entre hormonas, péptidos, proteínas, proenzimas o zimógenos, enzimas, coenzimas, vitaminas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos hidrofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos como oligonucleótidos, polinucleótidos y células o combinaciones de los mismos.

De forma preferida, el ingrediente activo puede:

- 40 - tener actividad antifúngica, antiséptica o antiinflamatoria,
- ser de aplicación, en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa o en terapia celular, como por ejemplo un factor de crecimiento,
- ser de interés en cosmética o higiene, como por ejemplo un péptido o proteína, o bien un derivado de ácido nucleico, tal como un plásmido de ADN, oligonucleótido, ARN de interferencia o un polinucleótido. El plásmido de ADN es aquel que incorpora material genético para ser introducido en células y expresar proteínas o bien que actúe como precursor de RNA.

- 45 En este mismo sentido según una realización preferida, el ingrediente activo es un siRNA. Según una realización preferida la proporción del ingrediente activo incorporado en las nanopartículas es igual o inferior al 25% en peso con respecto al peso total de los componentes de las mismas. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso del ingrediente activo que va a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración. Según otra realización preferida, la proporción de ingrediente activo se encuentra entre 0,5 y 2% en peso.

En otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden, adicionalmente, al menos un marcador. En la presente invención se entiende como "marcador" aquel elemento, compuesto, célula o conjunto de células que permita realizar un estudio de localización del mismo, obtener una imagen, señal o información del lugar

o los lugares en los que se distribuye, determinar un parámetro bioquímico, inmunológico o metabólico o bien realizar un diagnóstico. Son ejemplos de marcadores una molécula fluorescente, como por ejemplo fluoresceína o Texas Red; quantum dots; un isótopo radiactivo; un agente de contraste, por ejemplo radiológico, de resonancia o de tomografía; un antígeno de membrana; un agente de tinción, etc.

- 5 Según otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden adicionalmente al menos un compuesto capaz de facilitar o reforzar el efecto del ingrediente activo, tal como por ejemplo un adyuvante, un inmunomodulador (inmunosupresor o inmunoestimulador) o cualquier combinación de los mismos.

- Según otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden adicionalmente al menos un compuesto que interacciona con componentes biológicos y/o con afinidad por uno o varios receptores existentes en los seres vivos y/o que actúa como receptor de algún componente biológico, tales como un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie o cualquier combinación de los mismos. Algunas de las funciones de estos compuestos que interaccionan con componentes biológicos pueden ser la realización de un estudio de localización de dichos componentes biológicos o receptores, obtención de una imagen, señal o información del lugar o los lugares en los que se encuentran, determinación de un parámetro bioquímico, inmunológico o metabólico o bien realizar un diagnóstico.
- 10
- 15

Según otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden adicionalmente al menos un compuesto estabilizante de tipo lipídico, graso u oleoso, sacarídico, un derivado de aminoácido o proteico, un derivado de óxido de etileno, un compuesto de tipo morfolino o cualquier combinación de los mismos.

- 20 Según otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden adicionalmente al menos un compuesto sensible a polimerización química o polimerización inducida por radiación UV/Vis (fotopolimerización), calor (polimerización térmica), microondas, ultrasonidos y rayos X.

- Según otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden adicionalmente agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes blanqueadores, agentes antiseborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, o cualquier combinación de los mismos.
- 25

Según otra realización particular las nanopartículas de la presente invención se encuentran en forma liofilizada o deshidratada.

- Como se ha descrito anteriormente, las nanopartículas de la invención pueden formar parte de una composición nutricional. Dicha composición nutricional puede ser un alimento, un suplemento dietético o un suplemento nutricional. Las composiciones nutricionales pueden incluir leche, yogures, zumos de fruta y de vegetales, postres, productos infantiles o productos deshidratados. La adición de las nanopartículas a la composición nutricional se realiza mediante mezcla y homogenización según el procedimiento técnico para elaborar cada producto. Adicionalmente, otros componentes tales como las vitaminas pueden añadirse a la composición nutricional. Ejemplos de estos compuestos son vitaminas del grupo A, B, C, D, E o mezclas de las mismas.
- 30

- 35 Una realización particular, se refiere al uso de las nanopartículas según se han definido anteriormente para la preparación de vacunas.

Una realización preferida de la invención, se refiere al uso de las nanopartículas según se han definido anteriormente para su empleo en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y terapia celular.

- Según otra realización preferida, se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, como marcador.
- 40

Según otra realización particular, la invención se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, para fines diagnósticos.

- Según otra realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, para su administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, pulmonar, ótica, vaginal, intrauterina, rectal, entérica o parenteral.
- 45

Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, en la preparación de un producto cosmético o de higiene personal para la administración sobre piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes o mucosas.

- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para terapia génica, silenciamiento o interferencia genética, o vacunación genética.
- 50

Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para producir la asociación, expansión o activación de poblaciones celulares o para manipular o alterar las características biológicas de células vivas tanto autólogas, como alogénicas, xenogénicas o de cultivos celulares y posteriormente emplear dichas células o grupos

celulares para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico, preventivo o con fines regenerativos, o para modificar la producción de compuestos por dichas células, o para adaptarlas y asociarlas de modo efectivo a micropartículas o microcápsulas, matrices y andamiajes.

5 Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para facilitar, estimular o modificar la producción de compuestos por células, con fin de producción biotecnológica.

Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas con la finalidad de higiene o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado.

10 Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para modificar, corregir o introducir propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad en un medicamento o en un producto cosmético o de higiene personal.

15 Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para acondicionar, modificar o restablecer las características de agua, alimentos o suplementos nutricionales, así como para modificar, corregir o introducir nuevas propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad de los mismos y para facilitar o hacer posible la administración de alimentos o nutrientes a seres vivos.

Procedimiento de preparación de las nanopartículas

El procedimiento para la preparación de las nanopartículas descritas anteriormente, comprende las siguientes etapas:

- 20 a) preparar una fase orgánica que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%;
- b) mezclar bajo agitación la disolución obtenida en a) con una disolución acuosa.

25 El procedimiento de preparación de las nanopartículas de la invención es un método sencillo que no requiere el empleo de inyección u homogeneización. El procedimiento transcurre en condiciones suaves y pese a que los componentes presentan una baja hidrofilia no se requiere la fusión de los componentes, evitando la degradación de moléculas bioactivas que se pretenda asociar a los sistemas.

Como se describió anteriormente, es posible incorporar diferentes componentes a los sistemas nanoparticulares de la invención, lo cual aporta una enorme versatilidad a los mismos en términos de características físico-químicas y de interacción con otros componentes. La incorporación de esos componentes adicionales favorece que los sistemas de la invención asocien tanto moléculas lipofílicas (ej. la oleilamina) como hidrofílicas (ej. siRNA).

30 Dichos componentes que adicionalmente puede comprender el sistema, como por ejemplo una sustancia catiónica, una sustancia aniónica, o ambas, se pueden adicionar a la fase orgánica de la etapa a) o a la fase acuosa de la etapa b), dependiendo de las características de la sustancia que se incorpore al sistema. Así, en una realización particular, la fase orgánica de la etapa a) y/o la disolución acuosa de la etapa b) además comprende una sustancia catiónica, una sustancia aniónica o ambas.

35 Alternativamente, los componentes adicionales pueden incorporarse en una etapa c) posterior a la etapa b). Dicha etapa c) comprende la incubación de la dispersión de nanopartículas formadas en la etapa b) con una disolución que comprende una sustancia catiónica, un polímero aniónico o una combinación de ambos. En otra realización particular, la disolución del componente adicional de la etapa c) está en una proporción v/v de entre 5/1 a 1/5 dispersión de nanopartículas/disolución del componente adicional, preferiblemente en una proporción 1/1.

40 Alternativamente, es posible obtener nanopartículas pegiladas o modificadas con derivados de óxido de etileno. Estas nanopartículas pegiladas o modificadas con derivados de óxido de etileno se pueden preparar en una única etapa y además tiene la ventaja de que no es necesario ninguna reacción química a fin de anclar las cadenas de óxido de etileno a la superficie de las nanopartículas.

Así, en otra realización particular la fase orgánica de la etapa a) comprende además un derivado de óxido de etileno.

45 De este modo, la cadena lipofílica de ácido graso se quedará anclada en el seno de la estructura nanoparticular, mientras que las cadenas de óxido de etileno, por disponerse en el proceso de formación dirigidas hacia la fase acuosa, se encontrarán en las nanopartículas resultantes dispuestas en la superficie de las mismas.

50 En una realización particular, el disolvente de la fase orgánica es un solvente hidromiscible. En una realización más particular, el disolvente se selecciona entre alcoholes alifáticos, preferentemente etanol. El empleo de etanol favorece que sea eliminado mediante evaporación y además se caracteriza por ser más inocuo y afectar menos a las moléculas a asociar que cualquiera de los disolventes orgánicos que se emplean habitualmente en la elaboración de sistemas basados en materiales de baja hidrofilia.

Según una realización preferida, el éster de sorbitán se disuelve en la fase orgánica en una concentración de entre 0,1 y 10 mg/ml, más preferiblemente entre 2 y 7 mg/ml.

Según una realización preferida, los componentes dotados de carga, sustancias aniónicas o catiónicas, se disuelven en la fase acuosa u orgánica dependiendo de su naturaleza, a una concentración de entre 0,01 y 1,0 mg/mL, más preferiblemente entre 0,2 y 0,5 mg/mL.

Según otra realización preferida, al menos una de las disoluciones de los constituyentes del sistema nanoparticular se calienta antes de ser mezcladas.

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende además la adición de un ingrediente activo, y/o un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos, en una de las disoluciones a) o b) dependiendo de su carácter lipofílico o hidrofílico. Alternativamente, el procedimiento comprende la adición de un ingrediente activo, y/o un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos, en una etapa c) posterior a la etapa b).

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende una etapa adicional después de la etapa b) o de la etapa c) en la que las nanopartículas se someten a un proceso de deshidratación total o parcial (liofilización o desecación, respectivamente). De este modo es posible preservarlas durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales y se reduzcan los volúmenes de producto que van a manipularse. El proceso de liofilización o desecación conduce, respectivamente, a un producto deshidratado total o parcialmente.

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende una etapa adicional en la que se regeneran las nanopartículas deshidratadas parcialmente o liofilizadas. De este modo es posible deshidratar las nanopartículas para obtener un producto más estable durante el almacenamiento y posteriormente regenerar o recuperar las nanopartículas mediante un proceso de resuspensión en un medio acuoso. Las nanopartículas regeneradas conservan las propiedades que caracterizan a las nanopartículas frescas o recién preparadas (previo a someterlas a un tratamiento de deshidratación).

Mediante el procedimiento anteriormente descrito, se obtienen las nanopartículas descritas anteriormente. La interacción electrostática que resulta entre los diferentes componentes de las nanopartículas en el proceso de preparación o tras la incubación de la dispersión de nanopartículas una vez formadas con componentes opcionales genera entidades físicas características, que son independientes y observables.

De este modo, un último aspecto de la invención se dirige a nanopartículas obtenibles como se describió anteriormente.

A continuación, para una mayor comprensión de las características y ventajas de la presente invención, se hará referencia a una serie de ejemplos que de forma explicativa completan la descripción anterior, sin suponer en modo alguno que ésta se vea limitada a los mismos.

EJEMPLOS

Durante la exposición de algunos de los siguientes ejemplos se hace referencia a resultados obtenidos mediante las siguientes técnicas:

La caracterización morfológica de las nanopartículas se llevó a cabo por microscopía electrónica de transmisión. Como paso previo a la visualización por microscopía electrónica de transmisión (CM 12 Philips, Eindhoven, Holanda), se recurrió a la tinción de las muestras utilizando una solución de ácido fosfotúngstico al 2%. Para ello, sobre una rejilla de 400 µm de luz de malla, recubierta con una película de Formvar®, se añadieron 10 µL de la suspensión de nanopartículas. Transcurrido 1 minuto, se desecó por capilaridad la muestra con papel filtro, tocando suavemente el borde de la gota con un trozo del papel. La etapa siguiente consiste en la tinción propiamente dicha con 10 µL de ácido fosfotúngstico al 2%, que se deja actuar sobre la muestra durante 1 minuto, transcurrido el cual se procede a secar nuevamente el exceso de líquido como se acaba de comentar. A continuación se realiza un lavado de la rejilla con agua durante 30 segundos para retirar el exceso de ácido fosfotúngstico, tomando después las mismas precauciones para secarla. Por último, las muestras se mantienen en los correspondientes portamuestras dentro de un desecador hasta su observación.

El tamaño de las nanopartículas ha sido determinado mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y haciendo uso, para ello, de un Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) obteniendo el tamaño medio de la población y el índice de polidispersión de la misma. Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en agua mili-Q.

El potencial Zeta de las nanopartículas ha sido determinado mediante la técnica de anemometría por dispersión de láser (LDA) y haciendo uso, para ello, de una Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en una disolución milimolar de KCl.

La eficiencia de asociación de material genético a las nanopartículas ha sido determinada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA, Tris 40mM, Ácido acético 1%, EDTA 1mM) pH 8 con bromuro de etidio (10 mg/mL, 5 mL) y se utilizó un tampón de carga y marcador de migración compuesto de glicerina (30%), azul de bromofenol (0.25%) y xileno cianol (0.25%). Se aplicó una diferencia de potencial de 100 mV durante 30 minutos y se empleó material genético libre como control.

Los siguientes polímeros, tal y como se utilizan en los siguientes ejemplos, fueron adquiridos a diferentes casas comerciales: Ácido hialurónico, o hialurónico (Bioibérica, Spain), sulfato de condroitina (Calbiochem, USA), El plásmido de ADN pEGFP fue adquirido de Elim Biopharmaceuticals (CA, USA).

El RNA de interferencia (siRNA) siGAPDH fue adquirido de Ambion (USA). Los diferentes ésteres de sorbitán, junto con los Brij® y Mirj® empleados en el desarrollo de las nanopartículas, fueron adquiridos a Sigma (España).0.48-1.44

Los restantes productos indicados en los ejemplos que aparecen a continuación, fueron adquiridos a Sigma (España).

Ejemplo 1: Preparación de nanopartículas elaboradas a base de componentes de baja hidrosolubilidad incorporando un éster de sorbitán (ejemplo de referencia).

Se prepararon nanopartículas empleando como componente un copolímero de ácido láctico y glicólico 50:50 de peso molecular 14KDa (Resomer® RG502S, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Germany) (PLGA) de acuerdo con la técnica descrita por Gref y col., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51, 2001, 111-118. Para ello se disolvieron 25 mg de PLGA en 2 ml de diclorometano y sobre esta fase orgánica se añadieron 25 ml de una solución acuosa al 0.3% (w/v) de alcohol polivinílico 50k (30000-70000 g/mol, Aldrich, España), emulsificándose ambas fases con ayuda de una punta de ultrasonidos Branson a 40W durante 60 segundos. A continuación se eliminó rápidamente el disolvente orgánico mediante evaporación a vacío en un rotavapor Büchi (Alemania). Como muestra la Tabla 1, las nanopartículas obtenidas presentan un tamaño medio de 175 nm.

Asimismo, se prepararon nanopartículas siguiendo el mismo protocolo y empleando el componente anterior junto con monooleato de sorbitán (Span® 80) en una proporción de PLGA:éster de sorbitán de 39:1. Como se puede ver en la Tabla 1, cuando se incorpora el éster de sorbitán en un pequeño porcentaje, el tamaño de las nanopartículas obtenidas es similar al obtenido empleando únicamente el copolímero de ácido láctico y glicólico.

Por otro lado, se intentaron preparar nanopartículas siguiendo el mismo protocolo pero empleando exclusivamente el éster de sorbitán. Sin embargo, cuando se emplea como único componente el éster de sorbitán lo que se obtiene es un agregado, como se recoge en la Tabla 1.

En la Figura 1 se puede observar una fotografía de las nanopartículas elaboradas empleando PLGA:éster de sorbitán en una relación de 39:1 (izquierda) y del agregado obtenido cuando se emplea exclusivamente el éster de sorbitán (derecha).

Tabla 1: Caracterización de las nanopartículas elaboradas empleando monooleato de sorbitán (Span® 80) (NP80) y otros componentes como un copolímero del ácido láctico y glicólico (PLGA) o Polietilenglicol dodecil éter (Brij) mediante la técnica de emulsión-evaporación (O/W).

Formulación	Tamaño (nm)	PDI
PLGA O/W	178,7 ± 0,8	0,07
NP80-PLGA O/W 39-1	174,3± 0,5	0,12
NP80 100% O/W	Agregado	---

Por otro lado, se intentaron desarrollar nanopartículas empleando la técnica de nanoprecipitación como la descrita por Paolicelli y col., Nanomedicine, 5, 2010, 843-853, técnica que resulta frecuente en el desarrollo de nanopartículas lipídicas, y recurriendo al empleo de un conocido agente tensioactivo como el Polietilenglicol dodecil éter o Brij® 30. Concretamente, se preparó una disolución orgánica de Span® 80 (6.6 mg/mL) y Brij®30 (0.33 mg/mL) en 30 mL de etanol. Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q sometida a agitación magnética. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen hasta un volumen final de 10 mL. El resultado final es una solución micelar y no nanopartículas. De ello dejan constancia los

resultados obtenidos haciendo uso del equipamiento habitualmente empleado para la determinación del tamaño de nanopartículas, equipamiento que en las condiciones descritas no permite detectar nanopartículas en suspensión y no puede, por consiguiente, efectuar el correspondiente cálculo del tamaño medio de nanopartícula.

Ejemplo 2. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y modulación de su carga superficial mediante incorporación de oleilamina (OA), bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y cloruro de benzaconio (BZC).

Para la preparación de nanopartículas de Span® 80 se preparó una disolución orgánica de Span®80 (6.6 mg/mL) en 30 mL de etanol. Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.

Por otro lado, se prepararon nanopartículas incorporando oleilamina (OA), bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) o cloruro de benzaconio (BZC), con el objetivo de modular la carga superficial de las partículas y mejorar sus interacciones con moléculas con carga negativa, como por ejemplo material genético, permitiendo su asociación. Para ello se incorporaron dichos componentes en la fase etanólica a una concentración de 0.33 mg/mL y se procedió de acuerdo con el método anteriormente descrito.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de Monooleato de sorbitán (Span® 80) (NP80). La incorporación a dichas nanopartículas de OA, CTAB o BZC (NP80OA, NP80CTAB o NP80BZC) se ha realizado con el objetivo de modular la carga superficial de dichas nanopartículas. (PDI: Índice de polidispersión)

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP80	156,2 ± 7,5	0,08	-28,3 ± 4,6
NP80OA	136,1 ± 2,6	0,13	+52,0 ± 3,1
NP80CTAB	172,1 ± 2,9	0,08	+51,2 ± 1,5
NP80BZC	166,4 ± 4,8	0,08	+43,6 ± 5,6

Como se puede observar en la Tabla 2, todos los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 150 nm. Las nanopartículas elaboradas empleando exclusivamente Span® 80 presentan una potencial zeta negativo (de aproximadamente -30 mV) y este potencial puede ser modulado mediante la incorporación de las moléculas catiónicas OA, CTAB o BZC. Concretamente, empleando dichas moléculas es posible llegar a invertir completamente la carga superficial de negativa a positiva, llegando a alcanzar valores de alrededor de +50 mV.

Los sistemas nanoparticulados también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, para evaluar la morfología. A modo de ejemplo en la Figura 1 se puede observar la morfología de las NP preparadas con Span® 80 y OA, Span® 80 y CTAB o Span® 80 y BZC.

Ejemplo 3. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y asociación de RNA interferente (siRNA) como ingrediente activo.

Los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA, CTAB y BZC fueron empleados para asociar un ingrediente activo. Para ello se seleccionó siRNA, molécula cargada negativamente, que se incorporó por incubación a las nanopartículas mencionadas. Concretamente, el correspondiente material genético disuelto en agua miliQ a una concentración de 0.10, 0.20 o 0.30 mg/mL se incorporó en un volumen de 200 microlitros a 200 microlitros de la suspensión de nanopartículas (concentración final de siRNA de 0.05, 0.10 o 0.15 mg/mL), manteniéndose el conjunto en un incubador a 37 °C durante dos horas.

Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de Monooleato de sorbitán (Span® 80) asociando RNA interferente (siRNA). La carga superficial de dichas nanopartículas ha sido modulada mediante la incorporación de OA, CTAB o BZC (NP80OA, NP80CTAB o NP80BZC). (PDI: Índice de polidispersión).

Formulación	siRNA (mg/mL)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP80OA-RNA	0,05	118,6 ± 3,2	0,10	+49,6 ± 3,0
NP80OA-RNA	0,10	124,3 ± 5,8	0,10	+38,3 ± 1,2
NP80OA-RNA	0,15	121,8 ± 3,3	0,09	+36,2 ± 0,8
NP80CTAB-RNA	0,05	118,6 ± 3,2	0,08	+42,8 ± 3,3
NP80CTAB-RNA	0,10	168,8 ± 2,5	0,10	+41,6 ± 0,5
NP80CTAB-RNA	0,15	175,1 ± 3,6	0,08	+42,9 ± 0,7
NP80BZC-RNA	0,05	171,4 ± 10,5	0,07	+27,4 ± 0,6
NP80BZC-RNA	0,10	171,2 ± 10,6	0,09	+27,3 ± 0,6
NP80BZC-RNA	0,15	170,6 ± 9,3	0,08	+21,0 ± 1,3

Al incorporar el siRNA se pudo observar una disminución del potencial zeta positivo en relación al sistema blanco (sin material genético asociado), cuyos valores se muestran en la Tabla 2 asociada al Ejemplo 2. Ello se debe a la asociación del siRNA, molécula aniónica, a la superficie del sistema nanoparticulado.

- 5 Los sistemas nanoparticulados también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, para evaluar la morfología. A modo de ejemplo en la Figura 3 se puede observar la morfología de las nanopartículas asociando siRNA preparadas empleando Span® 80 y OA (imagen superior) o Span® 80 y BZC (imagen inferior).

La asociación del siRNA a los sistemas pudo ser confirmada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. La Figura 4 muestra uno de los geles obtenidos, concretamente para los sistemas elaborados empleando Span® 80 y con su carga superficial modificada mediante la incorporación de OA o CTAB. En dicho gel se pueden observar las bandas debidas a la presencia de siRNA. Como se puede apreciar, cuando el siRNA se deposita en forma libre migra a lo largo del gel dando lugar a una banda característica (A). Las nanopartículas blancas no dan lugar a banda alguna, por no asociar siRNA (H e I). Por el contrario, cuando el siRNA ha sido asociado a las nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y OA, dicha banda no migra y permanece en los pocillos de salida del gel (B, C, y D), confirmando que no se encuentra en forma libre, sino eficazmente asociado a los sistemas nanoparticulares depositados en los pocillos de dicho gel. Una situación intermedia se observa cuando el siRNA se asocia a las nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y CTAB. Como se puede apreciar, la asociación es eficaz a bajas concentraciones de siRNA, no observándose migración de la banda (G). Sin embargo, a mayores concentraciones de siRNA (E y F), hay una débil banda que sale de los pocillos, indicando una migración parcial del siRNA o, en otras palabras, que el siRNA no ha quedado asociado a las nanopartículas en su totalidad.

La diferente capacidad de asociación observada por las nanopartículas podría deberse a que, pese a que la CTAB es una amina cuaternaria y, por tanto, posee una carga positiva superior con la que asociar el siRNA respecto a la OA (amina primaria), el impedimento estérico que podría producirse en la CTAB podría dificultar la asociación de siRNA a elevadas concentraciones de éste, a diferencia de lo que ocurre con la OA.

25 Ejemplo 4. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monolaurato de sorbitán (Span® 20) y modulación de su carga superficial mediante incorporación de OA, CTAB y BZC.

Se prepararon nanopartículas de Span® 20 según el procedimiento previamente descrito en el Ejemplo 2. Además de las nanopartículas elaboradas exclusivamente empleando Monolaurato de sorbitán (Span® 20), se procedió en otras formulaciones de nanopartículas a la incorporación de OA, CTAB y BZC, con el objetivo de modular la carga superficial de las nanopartículas y permitir la asociación a las mismas de moléculas bioactivas de carga negativa, como por ejemplo, material genético.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas elaborados a base de Span® 20 y OA se encuentran recogidos en la Tabla 4 y en las Figuras 10 y 11 en las columnas correspondientes a tiempo 0. Los resultados de la caracterización de los sistemas elaborados a base de Span® 20 y CTAB o BZC se encuentran recogidos en las Figuras 10 y 11 en las columnas correspondientes a tiempo 0.

Tabla 4: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de Monolaurato de sorbitán (Span® 20) (NP20). La incorporación de OA (NP20OA) se ha realizado con objeto de modular la carga superficial de dichas nanopartículas. (PDI: Índice de polidispersión).

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP20	133,9 ± 5,6	0,09	-30,7 ± 0,8
NP20OA	176,6 ± 7,4	0,09	+54,1 ± 1,5

- 5 Como se puede observar en la Tabla 4, los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 140 nm. Las nanopartículas elaboradas empleando exclusivamente Span® 20 presentan una potencial zeta negativo (de aproximadamente -30 mV) y éste potencial puede ser modulado mediante la incorporación de la molécula catiónica OA. Resultados similares se obtuvieron empleando CTAB o BZC en lugar de OA, como se muestra en las Figuras 10 y 11, y Ejemplo 6. Concretamente, empleando dichas moléculas es posible llegar a invertir la carga superficial de negativa a positiva, llegando a alcanzar valores de alrededor de + 50 mV.

Los sistemas nanoparticulados también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, para evaluar la morfología. A modo de ejemplo en la Figura 5 se puede observar la morfología de las nanopartículas preparadas con Span® 20 y OA.

- 15 Ejemplo 5. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monolaurato de sorbitán (Span® 20) y asociación de RNA interferente (siRNA) como ingrediente activo.

- Los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 20 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA fueron empleados para asociar un ingrediente activo. Para ello se seleccionó siRNA, molécula cargada negativamente, que se incorporó por incubación a las nanopartículas mencionadas, de acuerdo con la metodología descrita en el Ejemplo 3. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 5.

Tabla 5: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monolaurato de sorbitán (Span® 20) asociando RNA interferente (siRNA). La carga superficial de dichas nanopartículas ha sido modulada mediante la incorporación de OA. (PDI: Índice de polidispersión)

Formulación	siRNA (mg/mL)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP20OA-RNA	0,05	180,4 ± 15,7	0,10	+40,6 ± 0,6
NP20OA-RNA	0,10	213,5 ± 18,3	0,13	+32,2 ± 1,3

- 25 Al incorporar el siRNA se pudo observar una disminución del potencial zeta positivo en relación al sistema blanco (sin material genético asociado), cuyos valores se muestran en la Tabla 5 asociada al Ejemplo 5. Ello se debe a la asociación del siRNA, molécula aniónica, a la superficie del sistema nanoparticulado.

- Los sistemas nanoparticulados también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, para evaluar la morfología. A modo de ejemplo en la Figura 6 se puede observar la morfología de las nanopartículas asociando siRNA preparadas empleando Span® 20 y OA.

- La asociación del siRNA a los sistemas pudo ser confirmada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. La Figura 7 muestra uno de los geles obtenidos, concretamente para los sistemas elaborados empleando Span® 20 y con su carga superficial modificada mediante la incorporación de OA. En dicho gel se pueden observar las bandas debidas a la presencia de siRNA. Como se puede apreciar, cuando el siRNA se deposita en forma libre migra a lo largo del gel dando lugar a una banda característica. Por el contrario, cuando el siRNA ha sido asociado a las nanopartículas, dicha banda no migra y permanece en los pocillos de salida del gel, confirmando que no se encuentra en forma libre, sino eficazmente asociado a los sistemas nanoparticulares depositados en los pocillos de dicho gel.

- 40 Ejemplo 6. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y Span® 20 con y sin modulación de carga mediante incorporación de OA, CTAB y BZC.

Los sistemas descritos en los Ejemplos 2 y 4 fueron sometidos a un estudio de estabilidad frente el tiempo. Para ello se almacenaron en nevera a 4°C las formulaciones de nanopartículas y al cabo de 30 y 60 días se comparó el tamaño medio de partícula y el potencial zeta con el determinado para las formulaciones recién elaboradas (0 días). En las Figuras 8, 9, 10 y 11 se puede observar que los parámetros analizados de tamaño y potencial zeta no experimentan modificaciones a lo largo del período de tiempo estudiado. El comportamiento mostrado por las formulaciones desarrolladas permite concluir que los sistemas nanoparticulares elaborados empleando Span® 80 y 20 con o sin modificaciones en su carga superficial mediante la incorporación de OA, CTAB y BZC, presentan una buena estabilidad física durante el tiempo que duró el ensayo, no existiendo diferencias significativas en el tamaño medio de partícula y en el potencial zeta con el paso del tiempo, para un nivel de significancia de 0,05 % (Test T Student).

Ejemplo 7. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de trioleato de sorbitán (Span® 85) y modulación de su carga superficial mediante incorporación de OA.

Se prepararon nanopartículas de Span® 85 según el procedimiento previamente descrito en el Ejemplo 2. Además, se prepararon nanopartículas incorporando OA, con objeto de modular la carga superficial de las partículas y mejorar sus interacciones con moléculas con carga negativa, como por ejemplo material genético.

Para ello se prepararon disoluciones orgánicas de Span® 85 (6.6 mg/mL) y OA (0.33 mg/mL) en 30 mL de etanol. . Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de trioleato de sorbitán (Span® 85) (NP85). La incorporación de OA a las nanopartículas (NP85OA) se ha realizado con objeto de modular la carga superficial de dichas nanopartículas. (PDI: Índice de polidispersión)

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP85	134,1 ± 12,6	0,09	-32,9 ± 1,6
NP 85OA	201,2 ± 8,4	0,06	+58,1 ± 1,9

Como se puede observar en la Tabla 6, todos los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 170 nm. Las nanopartículas elaboradas empleando exclusivamente Span® 85 presentan una potencial zeta negativo (de aproximadamente -30 mV) y éste potencial puede ser modulado mediante la incorporación de la molécula catiónica OA. Concretamente, empleando dicha molécula es posible llegar a invertir la carga superficial de negativa a positiva, llegando a alcanzar valores de alrededor de +60 mV.

Ejemplo 8. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monopalmitato de sorbitán (Span® 40) y modulación de su carga superficial mediante incorporación de OA.

Se prepararon nanopartículas de Span® 40 según el procedimiento previamente descrito en el Ejemplo 2. Además, se prepararon nanopartículas incorporando OA, con objeto de modular la carga superficial de las partículas y mejorar sus interacciones con moléculas con carga negativa, como por ejemplo material genético.

Para ello se prepararon disoluciones orgánicas de Span® 40 (6.6, 3.3 o 1.65 mg/mL) y OA (0.33 mg/mL) en 30 mL de etanol. Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base empleando monopalmitato de sorbitán (Span® 40) a diferentes concentraciones. La incorporación de OA a las nanopartículas (NP40OA) se ha realizado con objeto de modular la carga superficial de dichas nanopartículas. (PDI: Índice de polidispersión)

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP40 (6,6 mg/mL)	393,6 ± 71,3	0,48	-23,5 ± 0,9
NP40 (3,3 mg/mL)	172,3 ± 1,5	0,27	-24,3 ± 1,8
NP40 (1,65 mg/mL)	125,5 ± 1,49	0,16	-22,2 ± 1,8
NP40 (1,65 mg/mL)OA	1523,0 ± 65,7	0,78	+55,3 ± 1,7

Como se puede observar en la Tabla 7, las nanopartículas elaboradas empleando Span® 40 en una concentración de 6,6 mg/mL presentan un tamaño medio de unos 400 nm pero caracterizado por una baja homogeneidad en la distribución de tamaños (PDI de casi 0.5). Por el contrario, el ajuste de la concentración de Span® 40 empleada permite desarrollar sistemas nanoparticulados que presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 150 nm. Las nanopartículas elaboradas empleando exclusivamente Span® 40 presentan una potencial zeta negativo (de aproximadamente -20 mV) y este potencial puede ser modulado mediante la incorporación de una molécula catiónica, como por ejemplo OA. Concretamente, empleando dicha molécula es posible llegar a invertir la carga superficial de negativa a positiva, llegando a alcanzar valores de alrededor de +50 mV.

Ejemplo 9. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) e incorporación a su superficie de sulfato de condroitina o ácido hialurónico en una única etapa.

Se prepararon nanopartículas de Span® 80 según el procedimiento previamente descrito en el Ejemplo 2 pero incorporando en la fase acuosa moléculas destinadas a recubrir en una única etapa la superficie de las nanopartículas, como sulfato de condroitina o ácido hialurónico. Teniendo en cuenta que estas moléculas poseen carga negativa se incorporó a la fase orgánica OA, de carga positiva, destinada a modificar la carga de la superficie de las nanopartículas y facilitar la asociación del sulfato de condroitina o ácido hialurónico mediante interacciones del tipo electrostático.

Para ello se prepararon disoluciones orgánicas de Span® 80 (6.6 mg/mL) y OA (0.33 mg/mL) en 30 mL de etanol. Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q a la que se incorporó condroitina o ácido hialurónico en una concentración de 0.33 mg/mL y sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 8.

Tabla 8: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) incorporando en su superficie sulfato de condroitina o ácido hialurónico (NPcondroitina, NPhialurónico) en una única etapa.

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NPcondroitina	142,9 ± 0,4	0,09	-32,7 ± 0,7
NPhialurónico	163,0 ± 0,1	0,12	-24,3 ± 1,8

Como se puede observar en dicha Tabla, todos los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 150 nm. Los valores de potencial zeta son característicos de los polímeros empleados en el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas. Concretamente, el potencial zeta negativo de unos -30 mV confirma el recubrimiento de las nanopartículas con estos polímeros aniónicos. Estos resultados ponen de manifiesto la enorme versatilidad de las nanopartículas en cuanto a composición y carga superficial y la capacidad para ello recurriendo a una técnica que se desarrolla en una única etapa.

Ejemplo 10. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) e incorporación a su superficie de poliarginina en una única etapa.

Se prepararon nanopartículas de Span® 80 según el procedimiento previamente descrito en el Ejemplo 2 pero incorporando a la fase acuosa una molécula destinada a recubrir en una única etapa la superficie de las nanopartículas, la poliarginina. Teniendo en cuenta que esta molécula posee carga positiva no fue necesario incorporar en la fase orgánica OA como en el Ejemplo 9, sino únicamente Span®.

- 5 Para ello se preparó una disolución orgánica de Span® 80 (6.6 mg/mL) en 30 mL de etanol. Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q a la que se incorporó poliarginina en una concentración de 0.33 mg/mL y sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.
- 10 Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 9.

Tabla 9: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) incorporando en su superficie poliarginina (NPpoliarginina) en una única etapa.

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NPpoliarginina	229,7 ± 0,6	0,06	+28,2 ± 0,8

- 15 Como se puede observar en dicha Tabla, los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 200 nm. Los valores de potencial zeta son característicos del polímero empleado en el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas. Concretamente, el potencial zeta positivo de unos +30 mV confirma el recubrimiento superficial de las nanopartículas con el polímero catiónico poliarginina, que da lugar a una inversión de la carga negativa de las nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 sin recubrir. Estos resultados ponen de manifiesto la enorme versatilidad de las nanopartículas en cuanto a composición y carga superficial y la capacidad para ello recurriendo a una técnica que se desarrolla en una única etapa.
- 20

Ejemplo 11. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de ésteres de sorbitan incorporando ésteres o éteres de macrogol.

- 25 En el presente ejemplo se trató de incorporar a las nanopartículas ésteres y éteres de macrogol, debido a que poseen cadenas de óxido de etileno o polietilenglicol, las cuales presentan un gran interés para mejorar la interacción y estabilidad de los sistemas nanoparticulados con y en los medios y barreras biológicas. Estos componentes que presentan diferentes cadenas de polietilenglicol y cadenas lipofílicas fueron, concretamente, los indicados en la Tabla 9, donde se puede observar la composición de los mismos.
- 30 Tabla 10: Características de los éteres y ésteres de macrogol incorporados en una única etapa a las nanopartículas.

Nombre	Fórmula	Marca
Polietilenglicol dodecil éter	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_4OH$	Brij® 30
Polietilenglicol hexadecil éter	$C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_{10}OH$	Brij® 56
Polietilenglicol 2 octadecil éter	$C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_2OH$	Brij® 72
Polietilenglicol 8 octadecil éter	$C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_8OH$	Brij® 78
Polietilenglicol 8 estearato	$C_{18}H_{37}O(OCH_2CH_2)_8H$	Myrj® 45

- 35 Para la preparación de las nanopartículas con estos componentes se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Para ello se prepararon disoluciones orgánicas de Span® 80 (6.6 mg/mL) y Brij® o Myrj® (0.33 mg/mL) en 30 mL de etanol. Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q y sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 11.

Tabla 11: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) (NP80) y diferentes moléculas Brij® o Myrj®.

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP80-Brij® 30	152,7 ± 0,8	0,07	-28,9 ± 1,2
NP80-Brij® 56	138,9 ± 0,6	0,09	-46,7 ± 1,4
NP80-Brij® 72	169,1 ± 2,5	0,17	-47,8 ± 2,2
NP80-Brij® 78	147,7 ± 0,1	0,09	-26,3 ± 1,1
NP80-Myrj® 45	151,7 ± 1,0	0,12	-30,1 ± 1,6

Como se puede observar en dicha Tabla, todos los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 150 nm. Los valores de potencial zeta varían dependiendo de las características del derivado de óxido de etileno empleado en la elaboración de las nanopartículas, lo cual es característico cuando se emplea este tipo de moléculas en el recubrimiento de superficies. Estos resultados ponen de manifiesto la enorme versatilidad de las nanopartículas en cuanto a composición y carga superficial y la capacidad para ello recurriendo a una técnica que se desarrolla en una única etapa.

Por otro lado, se ha podido comprobar que únicamente es posible obtener nanopartículas empleando un porcentaje de ésteres de sorbitán comprendido entre el cien por cien y no menos del sesenta por cien con respecto a la masa total de los componentes empleados en la preparación de las nanopartículas.

Concretamente, como muestra la Tabla 12a, cuando el porcentaje de éster de sorbitán es inferior al 60% con respecto a la masa total de los componentes empleados en la preparación de las formulaciones, se obtiene una solución micelar transparente y no nanopartículas, habida cuenta de que el equipamiento habitualmente empleado para la determinación del tamaño de partícula no detecta nanopartículas en suspensión y no puede, por consiguiente, efectuar el correspondiente cálculo del tamaño medio de nanopartícula.

Tabla 12a: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) (NP80) y Brij® 30. (Ausencia: El ZetaSizer no detecta nanopartículas).

Formulación	Tamaño (nm)	PDI
NP80-Brij®30 80%-20%	163,9 ± 0,7	0,18
NP80-Brij®30 60%-40%	165,2 ± 1,5	0,37
NP80-Brij®30 40%-60%	Ausencia	---

Ejemplo 12. Liofilización de los sistemas nanoparticulares elaborados a base de ésteres de sorbitán y sus respectivas modificaciones.

Todos los sistemas nanoparticulares descritos en los ejemplos anteriores fueron liofilizados empleando como agente crioprotector glucosa o trealosa al 5% en una proporción 1:1 y 1:2 (volumen/volumen) de suspensión de nanopartículas:crioprotector. En las Tablas 12b y 13 se recogen los resultados de la caracterización de las nanopartículas recién preparadas y tras su liofilización y posterior resuspensión.

Tabla 12b: Tamaño de los sistemas nanoparticulares recién preparadas y tras su liofilización y posterior resuspensión, empleando como agente crioprotector glucosa al 5% en una proporción 1:1 y 1:2 (volumen/volumen) de suspensión de nanopartículas:crioprotector.

Formulación	Tamaño inicial (nm)	Tamaño (1:1) (nm)	Tamaño (1:2) (nm)
NP80	151,0 ± 4,5	155,2 ± 4,3	146,5 ± 2,5

NP80OA	134,9 ± 1,8	147,3 ± 1,9	137,5 ± 2,7
NP80CTAB	171,1 ± 1,1	202,2 ± 8,6	176,7 ± 4,1
NP80BZC	171,4 ± 3,5	176,6 ± 3,9	169,9 ± 2,5
NP20	133,9 ± 5,6	1721 ± 132	1125 ± 10
NP20OA	176,6 ± 7,4	3136 ± 1170	2905 ± 685
NP20CTAB	165,9 ± 3,7	359,8 ± 12,9	215,2 ± 6,8
NP20BZC	180,5 ± 6,2	239,3 ± 7,4	180,1 ± 2,7
NP85	136,2 ± 1,0	688,7 ± 30,4	614,3 ± 49,8
NP85OA	192,3 ± 0,4	219,0 ± 4,1	208,1 ± 2,0
NP40	125,5 ± 1,5	3181 ± 1933	8441 ± 483
NP40OA	1523 ± 65,7	1200 ± 212	1042 ± 44
NPcondroitina	142,9 ± 0,4	159,4 ± 2,3	143,2 ± 1,8
NPhialurónico	163,0 ± 0,1	312,2 ± 11,9	168,0 ± 2,2
NPpoliarginina	229,7 ± 0,6	1851 ± 69	927,2 ± 16,8

Tabla 13: Tamaño de los sistemas nanoparticulares recién preparadas y tras su liofilización y posterior resuspensión, empleando como agente crioprotector trealosa al 5% en una proporción 1:1 y 1:2 (volumen/volumen) de suspensión de nanopartículas:crioprotector.

Formulación	Tamaño inicial (nm)	Tamaño (1:1) (nm)	Tamaño (1:2) (nm)
NP80	151,0 ± 4,5	140,5 ± 3,7	135,1 ± 2,8
NP80OA	134,9 ± 1,8	143,7 ± 3,6	138,9 ± 5,9
NP80CTAB	171,1 ± 1,1	196,9 ± 3,6	220,7 ± 9,8
NP80BZC	171,4 ± 3,5	173,8 ± 3,0	178,0 ± 4,1
NP20	133,9 ± 5,6	3255 ± 533	1513 ± 106
NP20OA	176,6 ± 7,4	6266 ± 3164	3438 ± 910
NP20CTAB	165,9 ± 3,7	402,0 ± 15,1	274,9 ± 5,6
NP20BZC	180,5 ± 6,2	240,8 ± 6,0	137,8 ± 5,4
NP85	136,2 ± 1,0	235,1 ± 5,1	168,4 ± 5,2
NP85OA	192,3 ± 0,4	237,6 ± 3,6	236,6 ± 6,2
NP40	125,5 ± 1,5	4760 ± 983	2742 ± 1192
NP40OA	1523 ± 65	4965 ± 2465	3749 ± 921
NPcondroitina	142,9 ± 0,4	164,6 ± 1,9	154,6 ± 4,2
NPhialurónico	163,0 ± 0,1	243,0 ± 1,6	176,6 ± 7,2
NPpoliarginina	229,7 ± 0,6	1811 ± 83	526,5 ± 17,1

Los resultados obtenidos han permitido comprobar que mediante una adecuada selección del tipo y concentración del agente crioprotector es posible obtener polvos adecuados a partir de las suspensiones de nanopartículas y que el tamaño medio de partícula de dichas suspensiones no se ve modificado en la mayoría de las formulaciones a consecuencia del proceso de liofilización, con la trascendencia que ello tiene de cara a optimizar la estabilidad de los sistemas desarrollados. A título de ejemplo, en la Figura 12 se puede observar el aspecto de los sistemas nanoparticulares tras la liofilización con trealosa al 5%.

Ejemplo 13. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y asociación de una molécula antigénica como ingrediente activo para el desarrollo de una nanovacuna.

En el presente ejemplo se ha asociado la proteína rPorB a nanopartículas compuestas de ésteres de sorbitan para su uso como nanovacunas. Concretamente, los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA fueron empleados para asociar dicha porina. Dicha porina fue amablemente cedida por los Profesores Criado y Ferreirós del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, en una concentración de 7 mg/ml en un medio Hepes pH 7,4 10 mM, 0,1% SDS, 0,02% Thiomersal. Para la asociación de la misma a las nanopartículas se diluyó en agua Milli-Q hasta una concentración de 1 mg/ml, y esta disolución se incorporó en un volumen de 200 microlitros a 200 microlitros de la suspensión de nanopartículas, manteniéndose el conjunto en un incubador a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los resultados de la caracterización de los sistemas fueron los siguientes: Tamaño: $168,9 \pm 2,3$ nm y Potencial zeta: $+54,5 \pm 2$ mV. La eficacia de asociación de la proteína se calculó indirectamente a partir de la proteína libre recuperada en el sobrenadante, una vez fueron centrifugadas las nanopartículas (14000 rpm, 120 min, 4°C). La cantidad de proteína libre se determinó utilizando la técnica cuantitativa de BCA, obteniéndose un 97% de unión proteína-nanopartículas para la concentración de proteína de 1 mg/ml. Posteriormente se realizó un Dot Blott, técnica cualitativa que nos permite corroborar la unión proteína- nanopartículas, que de nuevo permitió confirmar dicha asociación nanopartículas-ingrediente activo.

Ejemplo 14. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y asociación de ADN plasmídico como ingrediente activo.

Los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA fueron empleados para asociar un ingrediente activo. Para ello se seleccionó un plásmido modelo (pEGFP), molécula cargada negativamente, que se asoció mediante incubación con las nanopartículas mencionadas. Concretamente, el correspondiente material genético disuelto en agua milliQ a una concentración de 0,3, 0,4, 0,5, 0,8 o 1 mg/ml se incorporó en un volumen de 100 microlitros a 100 microlitros de suspensión de nanopartículas (concentración final de pADN de 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5 mg/ml) manteniéndose el conjunto a temperatura ambiente bajo agitación mecánica suave en un agitador de vaivén, durante 2 horas. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 14.

Tabla 14: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y con carga superficial modulada mediante incorporación de OA (NP80OA), asociando ADN plasmídico (pADN). (PDI: Índice de polidispersión).

Formulación	pADN (mg/ml)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP80OA	----	$200,5 \pm 10,2$	0,08	$+ 35,3 \pm 3,5$
NP80OA-pADN	0,15	$340,3 \pm 15,3$	0,13	$- 11,1 \pm 0,4$
NP80OA-pADN	0,2	$287,1 \pm 5,1$	0,12	$- 19,5 \pm 1,5$
NP80OA-pADN	0,25	$295,2 \pm 8,3$	0,14	$- 20,5 \pm 0,3$
NP80OA-pADN	0,3	$317,6 \pm 3,2$	0,13	$- 22,2 \pm 0,4$
NP80OA-pADN	0,4	$314,3 \pm 5,2$	0,14	$- 20,4 \pm 0,2$
NP80OA-pADN	0,5	$337,7 \pm 9,5$	0,15	$- 20,0 \pm 1,8$

Al incorporar el ADN plasmídico se pudo observar un cambio del potencial zeta, pasando de positivo en las partículas blancas (sin material genético asociado), a valores negativos. Ello se debe a la asociación del plásmido, molécula aniónica, a la superficie del sistema nanoparticulado, lo cual confirma el proceso de asociación del ingrediente activo a los nanosistemas.

Los sistemas nanoparticulados también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, para evaluar la morfología. A modo de ejemplo en la Figura 13 se puede observar la morfología de las nanopartículas asociando pADN, preparadas empleando Span® 80 y OA (NP80OA-pADN).

La asociación del ADN plasmídico a los sistemas pudo ser confirmada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. La Figura 14 muestra uno de los geles obtenidos, concretamente para los sistemas elaborados empleando Span® 80 y con su carga superficial modificada mediante la incorporación de OA. En dicho gel se pueden observar las bandas debidas a la presencia de plásmido. Como se puede apreciar, cuando el plásmido se deposita en forma libre migra a lo largo del gel dando lugar a una banda característica (A). Por el contrario, cuando ha sido asociado a las nanopartículas, dicha banda no migra y permanece en los pocillos de salida del gel (B, C, D, E), confirmando que no se encuentra en forma libre, sino eficazmente asociado a los sistemas nanoparticulares depositados en los pocillos de dicho gel, lo que impide la migración del plásmido. De igual modo, se puede observar que cuando se continúa elevando la concentración de ADN plasmídico que se incubaba con las nanopartículas, el sistema no es capaz de asociar todo el ADN, por lo que se observa que, al menos una parte, migra a lo largo del gel (F y G).

Ejemplo 15. Eficacia de transfección de nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y asociando ADN plasmídico como ingrediente activo y expresión de la proteína codificada.

Los sistemas descritos en el ejemplo anterior fueron seleccionados para evaluar su capacidad de transfección celular y la correspondiente expresión de la proteína codificada por el plásmido. Concretamente, dichos sistemas son los elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA (NP80OA), asociando pEGFP en una concentración final de 0,2 mg de plásmido por ml de suspensión nanoparticulada (NP80OA-pEGFP 0,2 mg/ml). La línea celular empleada para la evaluación fue la línea HEK-293, evaluándose la expresión de proteína verde fluorescente codificada por el plásmido. Para ello, las células HEK-293 fueron sembradas a una densidad de 200.000 células por pocillo, en una placa de cultivo de 24 pocillos (BD Fiacon™), 24 h antes del ensayo. En el momento del ensayo, el medio de cultivo fue reemplazado por 300 µL de HBSS que contiene pEGFP libre o bien nanopartículas cargadas (NP80OA-pEGFP 0,2 mg/ml) incubándolas a diferentes concentraciones finales de plásmido (1, 2, 3 y 4 µg pEGFP/pocillo). La Lipofectamina 2000® (Invitrogen, España) se utilizó como control positivo de la transfección, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las nanopartículas fueron incubadas durante 6 horas. Transcurrido dicho período de tiempo, las células fueron lavadas y se les añadió 1 ml de medio de cultivo fresco.

Transcurridas 48 y 72 horas, se evaluó la transfección celular positiva mediante la determinación de GFP, detectada por microscopía de fluorescencia (Eclipse TE 2000-S, Nikon UK Ltd., UK).

Como se puede ver en las Figuras 15 y 16, los sistemas son capaces de transfectar eficazmente las células, lo cual se confirma mediante observación de la correspondiente expresión de proteína verde fluorescente. A medida que se incrementa la cantidad de plásmido aumenta la presencia de dicha proteína, siendo equiparables los niveles de transfección obtenidos con 3 µg con los correspondientes a 4 µg de plásmido asociado a las nanopartículas.

Ejemplo 16: Confirmación de la estructura matricial sólida de las nanopartículas de la invención.

En el presente ejemplo se demuestra la estructura matricial sólida de los nanosistemas de la invención a diferencia de otras estructuras que podrían comprender sorbitán como tensoactivo y que no son estructuras matriciales sólidas sino estructuras flexibles en forma de micelas, liposomas o niosomas uni o multilaminares, estructuras todas ellas conocidas en el estado de la técnica por su deficiente estabilidad. Para ello se ha recurrido a sofisticadas técnicas de resonancia magnética que permiten caracterizar su composición y estructura supramolecular.

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Agilent (Varian) Inova de 17.6 T (Freq. de resonancia de protón 750 MHz) equipado con una sonda de triple resonancia ¹H /¹³C /³¹P y triple eje de gradientes XYZ apantallados. Las muestras se prepararon disolviendo unos pocos miligramos del producto a estudiar (10 mg de Span 80 y 10 mg de OA) en 600 µL de H₂O. La muestra así disuelta se introduce en un tubo de RMN convencional de 5 mm de diámetro. Para el lock de deuterio se utilizó un estrecho capilar de vidrio relleno con DMSO deuterado. Este capilar va insertado coaxialmente a lo largo de todo el tubo de muestra y en particular dentro del volumen activo de muestra que detecta la sonda. Su contenido no entra en contacto con la disolución a estudiar ni por tanto altera sus propiedades.

Como formulaciones modelo a estudiar se han seleccionado las nanopartículas constituidas por monooleato de sorbitán, Span® 80 (SP80, un éster de sorbitán resultado de la esterificación de un grupo hidroxilo con el ácido oleico) a las que opcionalmente se le incorpora una sustancia catiónica, la amina grasa oleilamina (OA), la cual permite modular las características de los sistemas nanoparticulares.

Las nanopartículas desarrolladas a partir de dichos componentes se representan abreviadamente como en los ejemplos anteriores, como NP80 y NP80OA, respectivamente.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los diferentes estudios de resonancia realizados y las conclusiones extraídas.

Espectro monodimensional de protón (1D 1H):

Al comparar los espectros ^1H -RMN de las nanopartículas NP80 y NP80OA (figura 17, imagen superior e inferior respectivamente) con los espectros de las moléculas de Span 80 y OA aisladas y por separado (figura 18, imagen superior e inferior respectivamente) se observa que las señales correspondientes a las nanopartículas del sistema son mucho más anchas. Esta observación está en concordancia con el hecho de que el Span® 80 y la OA en las nanopartículas se encuentran formando parte de una especie macromolecular. Ya que si se tratase simplemente de la molécula libre (SP80 o OA) en la disolución se verían señales mucho más estrechas, del tipo de las que se pueden apreciar en la Figura 18, ya que los espectros de protón de los compuestos puros tienen menor anchura y mayor resolución de señal. En contraposición, una mayor anchura en la señal de RMN significa una menor movilidad molecular.

Hay que aclarar que en la zona entre 3-3.7 ppm aparecen una serie de señales estrechas y de poca intensidad. Se trata de una pequeña proporción de impurezas de bajo peso molecular como se comprobó con el espectro ^1H -Dfilter (ver a continuación).

Espectro ^1H -Dfilter ("Filtro de Difusión" o "Diffusion Filter"):

Para este experimento se utilizó la secuencia de eco estimulado con $\Delta = 350$ ms, $\delta = 1$ ms y gradiente de 65 G cm^{-1} . Este experimento de RMN proporciona un espectro de protón en el que se atenúa en mayor medida la intensidad de las señales de especies moleculares de tamaño pequeño (compuestos de bajo peso molecular) y en menor medida las de tamaño grande (molécula o agregado molecular de mayor masa molecular). El efecto de atenuación puede verse más claramente si se compara este espectro con el espectro 1D ^1H en el que las señales no son atenuadas y por tanto aparecen con su intensidad natural.

De este modo, si comparamos los espectros ^1H -Dfilter obtenidos para las nanopartículas de la invención NP80 y NP80OA (figura 19) con los espectros de la figura 17 se observa que las señales anchas de la figura 17 se mantienen en los espectros de filtro de difusión como señales anchas. Por el contrario, las señales correspondientes a los disolventes del experimento y las correspondientes a otras impurezas de bajo peso molecular en la zona entre 3-3.7 ppm, desaparecen. Además, en la figura 19 se aprecian mejor señales anchas entre 3.9 y 4.2 ppm que antes estaban enmascaradas con las impurezas de bajo peso molecular, y ahora se revelan como señales anchas que corresponden a la estructura cíclica del sorbitán.

En conclusión, se observa en estos espectros que desaparecen por completo las señales de impurezas de bajo peso molecular y que permanecen poco alteradas las señales de SP80 y de OA.

Del análisis conjunto de los espectros de protón y de difusión podemos concluir que las moléculas de SP80 y SP80-OA en los nanosistemas de la presente invención no se encuentran aisladas y en disolución sino que están formando parte de una especie supramolecular de grandes dimensiones.

Espectro STD:

Con este experimento basado en la transferencia de saturación podemos obtener espectros que reflejan interacciones entre protones tanto intra- como intermolecularmente. Se han obtenido tres espectros STD saturando selectivamente en cada uno de ellos una posición diferente del espectro. Se saturaron las posiciones de 0.12, 0.78 y 5.5 ppm.

Se realizó un experimento STD de control con saturación a 0.78 ppm que afecta específicamente a la señal del metilo de SP80. El espectro que se obtiene muestra todas las señales de la molécula SP80 (pero no las impurezas). Esta transferencia desde la señal del metilo hacia todas las señales de Span® 80 es consistente con que la molécula esté formando parte de un agregado de gran tamaño molecular (de mucho mayor tamaño que el esperado para la molécula libre), lo cual también es consistente con la gran anchura de sus señales mencionadas anteriormente.

El experimento STD con saturación a 0.12 ppm se muestra en la Figura 20. Esta posición de saturación corresponde con una zona del espectro donde no se aprecian señales de protones. En principio la saturación de una posición sin señales del espectro debería dar lugar a un espectro 1D STD completamente vacío de señales ya que no puede darse ninguna transferencia de saturación. Sin embargo, lo que se observa es lo contrario y en el espectro aparecen todas las señales de gran anchura que fueron previamente observadas en los espectros de las nanopartículas de la invención NP80 y NP80OA (figura 17).

Este mismo resultado se obtuvo al repetir el experimento STD saturando en otra zona diferente y también vacía del espectro a 5.5 ppm (figura 21).

Esto ya descarta la hipótesis referente a la existencia de zonas vacías del espectro. En otras palabras, dicho espectro confirma que sí que existen protones correspondientes a alguna molécula en esa zona del espectro. Por consiguiente, la única explicación a la existencia de un espectro de protón que tenga zonas aparentemente vacías pero en las que sin embargo se confirma la existencia de protones es que las señales sean de una anchura enorme.

Hay que tener en cuenta que RMN es una técnica cuantitativa, ya que el área de una señal está relacionado con el número de protones. Esto quiere decir que cuanto más ancha se hace una señal menos altura tiene, pero el área permanece.

Además de las señales que se ven en el espectro de protón, hay otras señales que tienen señales demasiado anchas. Ello se debe a que proceden de las mismas moléculas de la muestra pero que están situadas en zonas de la estructura (supramolecular) más rígidas (ej. interior de la partícula) que el resto de señales que sí vemos en el espectro que se encuentran en zonas más móviles (ej. exterior de la partícula), de acuerdo con una estructura como la representada en la Figura 22. Las señales de protones del interior rígido pueden ser extremadamente anchas y no distinguibles del nivel de ruido del espectro "invisibles". Las zonas más externas de la partícula tienen mayor flexibilidad molecular y generan señales de protón observables en el espectro. En un experimento STD la saturación de protones "invisibles" del interior se transfiere muy eficazmente en varias etapas hacia los protones del exterior de la partícula. El efecto puede observarse en un espectro STD porque aparecen las señales de los protones en las zonas más flexibles de la nanopartícula. Este modelo está de acuerdo con lo observado en el espectro STD de la Figura 20.

El espectro STD con saturación en la zona sin señal a 0.12 ppm transfiere a todo tipo de señales visibles del espectro. Esta transferencia puede ocurrir inicialmente desde residuos apolares que dieran señal en torno a 0.12 ppm y transferirse hacia el resto de señales visibles de la molécula.

El espectro STD con saturación en la zona sin señal a 5.55 ppm transfiere preferentemente hacia algunas señales visibles, las que están más próximas en la molécula al doble enlace C=C. Este experimento es más interesante ya que nos indica que las zonas apolares y polares de las moléculas deben estar ordenadas en la estructura macromolecular y separadas espacialmente de las apolares. De no ser así el experimento hubiera dado el mismo resultado que cuando saturamos en 0.12 ppm. Esto estaría de acuerdo con cualquiera de los modelos estructurales con ordenamiento de cadenas polares y apolares e interior acuoso o interior rígido. Se descartarían otros modelos que tuvieran cadenas no ordenadas por polaridad.

El espectro Waterlogsy aunque técnicamente es diferente del STD, conceptualmente puede considerarse como un experimento STD en el que la saturación se realiza en la señal del disolvente H₂O.

En los espectros de Waterlogsy obtenidos para las muestras de NP80 y NP80OA que recoge la Figura 23, el H₂O transfiere a todo tipo de señales visibles del espectro. Esta transferencia puede ocurrir inicialmente desde las zonas de la molécula expuestas al H₂O y transferirse hacia el resto de señales visibles de la molécula.

Para concluir y en base a los resultados de RNM obtenidos, las posibilidades de estructura supramolecular que podemos considerar son, por un lado, una estructura con ordenamiento de cadenas polares y apolares e interior acuoso, es decir, que permita movilidad a todas las cadenas poliméricas (estructura micelar clásica de un tensioactivo). Por otro lado, podría tratarse de una estructura sólida de interior rígido y sin disolvente, formada por cadenas poliméricas ordenadas, es decir con un grado de rigidez creciente desde el exterior hacia el interior (estructura matricial clásica de una nanopartícula). El primer modelo podría tener lugar teniendo en cuenta los espectros obtenidos de STD y Waterlogsy. Sin embargo, no deberían existir zonas con mucha rigidez y, por tanto, dicho modelo no está de acuerdo con lo obtenido en el espectro de difusión (1H Dfilter). Sin embargo, el segundo modelo o modelo de sistema nanoparticular sólido sí estaría de acuerdo con todos los espectros obtenidos. De todo ello podemos concluir que la presente invención se refiere a nanopartículas sólidas matriciales constituidas por Span® 80, lo cual las diferencia de estructuras flexibles en forma de micelas, liposomas o niosomas uni o multilaminares como los que se describen en la literatura para tensioactivos en general.

Ejemplo 17. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas liofilizadas elaboradas a base de Span® 80.

El sistema nanoparticular formado únicamente por Span® 80 (NP80), así como los sistemas descritos en el ejemplo 14, (NP80OA y NP80OA-pEGFP 0,2 mg/ml) han sido seleccionados para someterlos a un proceso de liofilización, empleando como agente crioprotector trealosa al 5% en una proporción 1:1 (volumen/volumen) de suspensión de nanopartículas: disolución de crioprotector y con el fin de realizar un estudio de estabilidad frente al tiempo. Para ello se sometieron a diferentes condiciones las muestras liofilizadas almacenadas, tales como 4°C en nevera, temperatura ambiente (25°C) y 37°C en estufa. Al cabo de 3 meses se comparó el tamaño medio de nanopartícula y el potencial zeta con el previamente determinado para las formulaciones recién preparadas, liofilizadas y resuspendidas (Liofilizadas T=0). En las Tablas 15, 16 y 17 se recogen los resultados de dicha comparación. En dichas Tablas se puede observar que los parámetros analizados de tamaño y potencial zeta apenas experimentan modificaciones significativas en el período de tiempo estudiado. Las formulaciones mantienen su tamaño nanoparticular, no detectándose fenómenos de agregación, lo cual permite concluir que los sistemas nanoparticulares elaborados empleando Span® 80 con o sin modificaciones en su carga superficial mediante la incorporación de OA, y con o sin la incorporación adicional de un ingrediente activo presentan una buena estabilidad física frente al almacenamiento en diferentes condiciones durante el tiempo que duró el ensayo, conservando en todas las formulaciones un tamaño nanométrico comprendido entre los 116,3±5,2 y los 279,1±30,5 nm.

Tabla 15. Tamaño y carga superficial de los sistemas nanoparticulares NP 80 recién preparados, liofilizados y resuspendidos (Liofilizadas T=0) y de dichos sistemas liofilizados tras 3 meses de almacenamiento sometidos a diferentes condiciones (TA: Temperatura ambiente). (PDI= índice de polidispersión).

NP80	Liofilizadas T=0	Liofilizadas y almacenadas 3 meses		
		TA	37°C	4°C
Tamaño (nm)	157,6±4,2	153,5±3,3	158,1±2,2	150,1±3,5
PDI	0,136	0,122	0,149	0,132
Potencial Zeta (mV)	-46,2±2,1	-35,3±9,2	-38,7±8,9	-40,1±2,1

5 Tabla 16. Tamaño y carga superficial de los sistemas nanoparticulares NP 80OA recién preparados, liofilizados y resuspendidos (Liofilizadas T=0) y de dichos sistemas liofilizados tras 3 meses de almacenamiento sometidos a diferentes condiciones (TA: Temperatura ambiente). (PDI= índice de polidispersión).

NP80OA	Liofilizadas T=0	Liofilizadas y almacenadas 3 meses		
		TA	37°C	4°C
Tamaño (nm)	201,2±4,8	211,1±4,1	279,1±30,5	206,8±5,2
PDI	0,152	0,142	0,281	0,148
Potencial Zeta (mV)	+46,7±3,2	+31,9±3,4	+11,5±6,4	+43,3±7,1

10 Tabla 17. Tamaño y carga superficial de los sistemas nanoparticulares NP80OA-pEGFP recién preparados, liofilizados y resuspendidos (Liofilizadas T=0) y de dichos sistemas liofilizados tras 3 meses de almacenamiento sometidos a diferentes condiciones (TA: Temperatura ambiente). (PDI= índice de polidispersión).

NP80OA-pEGFP	Liofilizadas T=0	Liofilizadas y almacenadas 3 meses		
		TA	37°C	4°C
Tamaño (nm)	250,1±15,7	176,7±7,2	192,5±10,4	217,1±12,4
PDI	0,301	0,209	0,371	0,179
Potencial Zeta (mV)	-24,8±2,9	-17,1±7,5	-28,1±9,9	-20,3±3,1

15 Los sistemas nanoparticulados liofilizados también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión, para evaluar su morfología. Para ello las muestras liofilizadas se incluyeron en EPON, posteriormente se realizaron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo (Leica UltraCut R) y se observaron en un microscopio (TEM JEOL JEM-1011). A modo de ejemplo en la Figura 24 se puede observar la morfología de las nanopartículas liofilizadas de NP80OA.

20 A continuación se determinó si la adecuada estabilidad física mostrada por las nanopartículas de la invención también permitía mantener la asociación de la molécula activa asociada durante el período estudiado. Concretamente, la efectiva asociación del ADN plasmídico a los sistemas liofilizados elaborados empleando Span® 80 y con su carga superficial modificada mediante la incorporación de OA, (NP80OA-pEGFP) y almacenados durante 3 meses en distintas condiciones y posteriormente resuspendidos, pudo ser confirmada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. La Figura 25 muestra uno de los geles obtenidos, en el cual se pueden observar las bandas debidas a la presencia de plásmido. Como se puede apreciar, cuando el plásmido se deposita en forma libre, migra a lo largo del gel dando lugar a una banda característica (A). Por el contrario, cuando ha sido asociado a las nanopartículas y dichos sistemas han sido sometidos a liofilización, almacenamiento durante tres meses en distintas condiciones y resuspensión, dicha banda no migra y permanece en los pocillos de salida del gel (B-J), confirmando que no se encuentra en forma libre, sino eficazmente asociado a los sistemas nanoparticulares depositados en los pocillos de dicho gel, lo que impide la migración del plásmido. Con ello podemos confirmar, que

tras el proceso de liofilización, almacenaje de 3 meses a diferentes condiciones y posterior resuspensión, las nanopartículas continúan asociando eficazmente el plásmido modelo.

Ejemplo 18. Asociación de una molécula lipofílica a nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80).

- 5 Los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA (NP80OA), fueron empleados para asociar una molécula de carácter lipofílico. Para ello se seleccionó la Rodamina B, como molécula lipofílica modelo.

10 Para la realización de las nanopartículas se preparó una disolución orgánica disolviendo en 30 ml de etanol los componentes Span® 80 (6.6 mg/mL), OA (0.33 mg/ml) y Rodamina B (0.16, 0.33, 1.66, 3.33, 6.66 microg/ml). Esta fase orgánica se adicionó sobre una fase acuosa de 60 mL de agua mili-Q sometida a agitación magnética, produciéndose la formación espontánea de nanopartículas. A continuación se eliminó el etanol en rotavapor y se concentró el volumen de la suspensión de nanopartículas hasta un volumen final de 10 mL. En ese volumen la concentración teórica final de Rodamina B en las formulaciones estudiadas es de 0,5, 1, 5, 10 y 20 microg/ml.

15 La eficacia de asociación de la Rodamina B se calculó indirectamente a partir de la molécula libre recuperada en el medio residual obtenido tras separar las nanopartículas mediante centrifugación (14000 rpm, 3,5 h, 4°C). La cantidad de Rodamina B libre se determinó recurriendo a la técnica cuantitativa de Espectroscopía UV a una longitud de onda de 554 nm. Los resultados de eficacia de asociación de la molécula lipofílica a los nanosistemas se encuentran recogidos en la Tabla 18.

20 Tabla 18. Eficacia de asociación de la molécula lipofílica Rodamina B a las nanopartículas elaboradas a base de monooleato de sorbitán (Span® 80) y con carga superficial modulada mediante incorporación de OA (NP80OA). (PDI: Índice de polidispersión)

Rodamina B (microg/ml)	Tamaño (nm)	PDI	% Asociación
0,5	213,7±3,2	0,087	99,9±2,5
1	191,1±3,4	0,096	88,1±10,5
5	192,2±3,1	0,092	82,1±3,7
10	181,9±4,6	0,093	81,9±7,8
20	165,8±7,2	0,073	79,2±3,7

Como puede apreciarse, las nanopartículas de la invención asocian eficazmente una molécula lipofílica.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%, caracterizada por ser una matriz sólida homogénea, donde el grupo éster tiene un sustituyente seleccionado entre C₆-C₂₄ alquilo, C₆-C₂₄ alquenilo y C₆-C₂₄ alquinilo.
- 5 2. La nanopartícula, según reivindicación 1, donde el éster de sorbitán se selecciona de entre el grupo consistente en mono-, di-, tri- o sesquioleato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesquilaurato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesquipalmitato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesquiestearato de sorbitán y mono-, di-, tri- o sesquisoestearato de sorbitán, y sus combinaciones.
- 10 3. La nanopartícula según reivindicación 1 o 2, donde el éster de sorbitán está en una proporción en peso de entre 80% y 100%.
4. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende una sustancia catiónica, una sustancia aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos.
5. La nanopartícula según la reivindicación 4, donde la sustancia catiónica se selecciona entre sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas.
- 15 6. La nanopartícula según la reivindicación 4, donde la sustancia aniónica es un polímero aniónico seleccionado de entre el grupo constituido por ácido hialurónico, ácido colomínico, ácido polisialico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furcelaranos, alginatos, agar-agar, glucomanano, goma de gelano, goma de algarrobo, goma de guar, goma de tragacanto, goma arábica, goma de xantano, goma de karaya, pectinas, celulosas, almidones, sus sales, fragmentos, derivados o combinaciones de los mismos.
- 20 7. La nanopartícula según la reivindicación 4, donde el derivado de óxido de etileno se selecciona de entre polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), polietilenglicol hexadecil éter (Brij 56), polietilenglicol 2-octadecil éter (Brij 72), polietilenglicol 8-octadecil éter (Brij 78), polietilenglicol 8-estearato (Myrj 45), 2-hidroxietil octadecanoato (Myrj 52), monoestearato de etilen glicol, monoestearato de trietilen glicol.
8. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende un ingrediente activo.
- 25 9. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición cosmética, una composición nutricional o un dispositivo médico que comprende una nanopartícula como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9.
12. Una nanopartícula como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento.
- 35 13. Una nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y terapia celular.
14. Una nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en terapia génica, silenciamiento o interferencia genética, o vacunación genética.
15. Un procedimiento para la preparación de una nanopartícula como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, que comprende las siguientes etapas:
 - 40 a) preparar una fase orgánica que comprende un éster de sorbitán donde el grupo éster tiene un sustituyente seleccionado entre C₆-C₂₄ alquilo, C₆-C₂₄ alquenilo y C₆-C₂₄ alquinilo, en una proporción en peso de entre 60% y 100%;
 - b) mezclar bajo agitación la disolución obtenida en a) con una disolución acuosa;
 donde no se usa inyección y donde el disolvente de la fase orgánica es un disolvente miscible en agua.
- 45 16. Una nanopartícula que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%, siendo una matriz sólida homogénea, obtenible mediante un procedimiento como se define en la reivindicación 15.

Figura 1

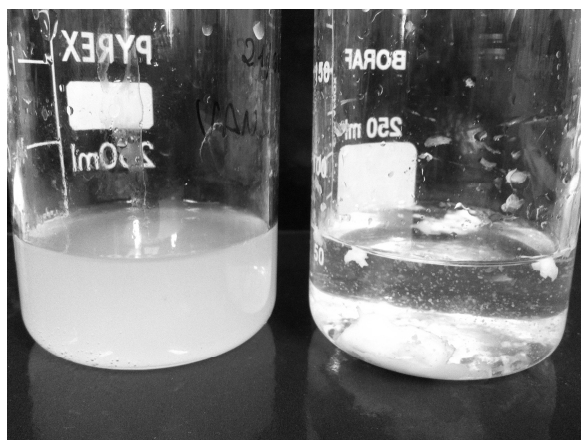


Figura 2

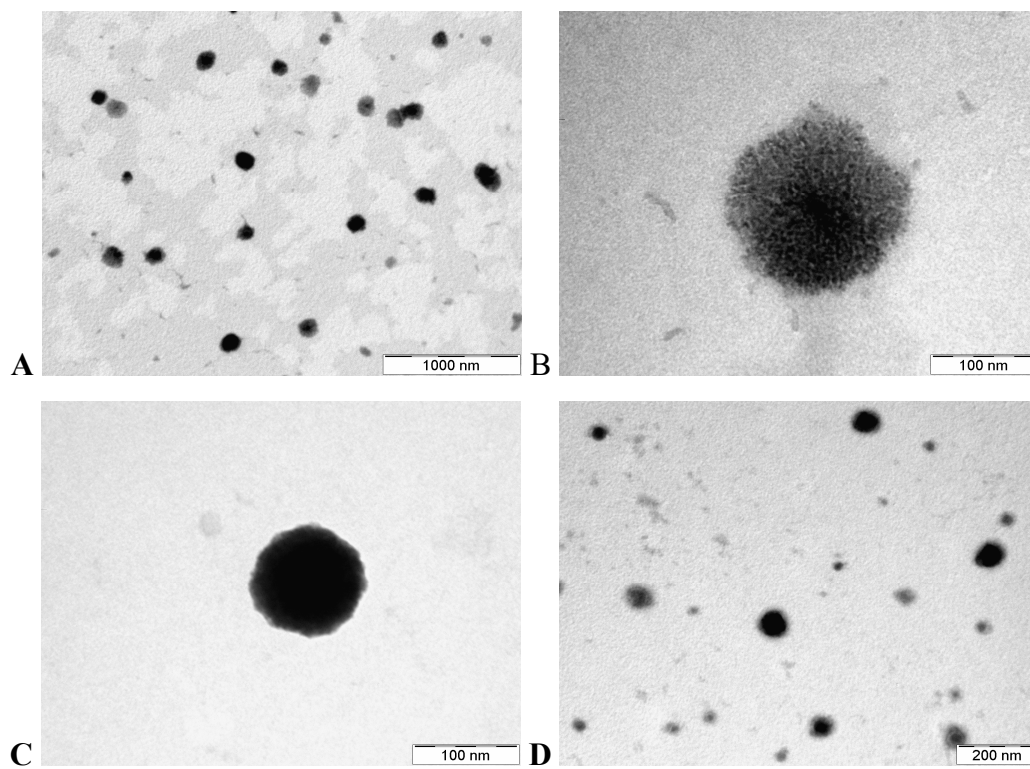


Figura 3

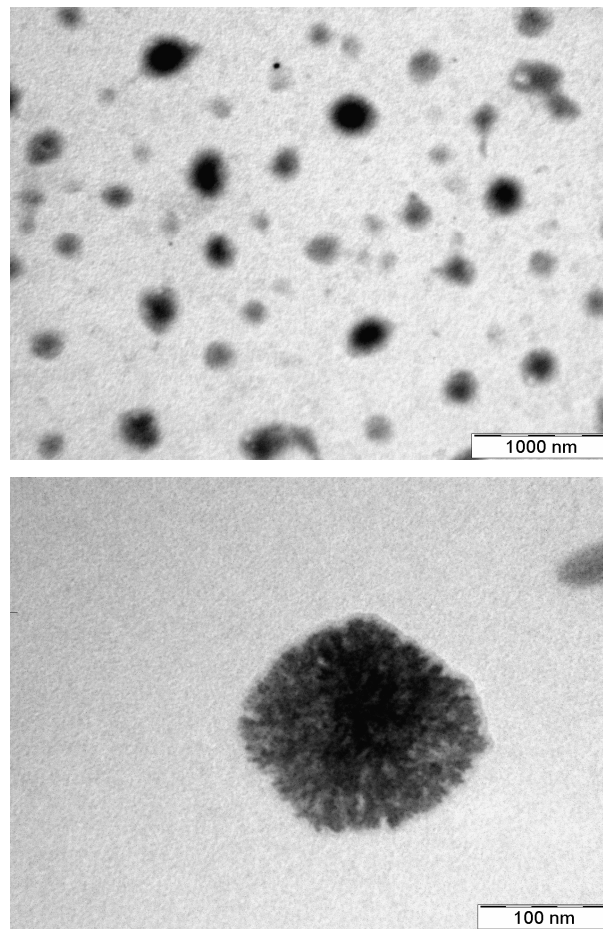


Figura 4



Figura 5

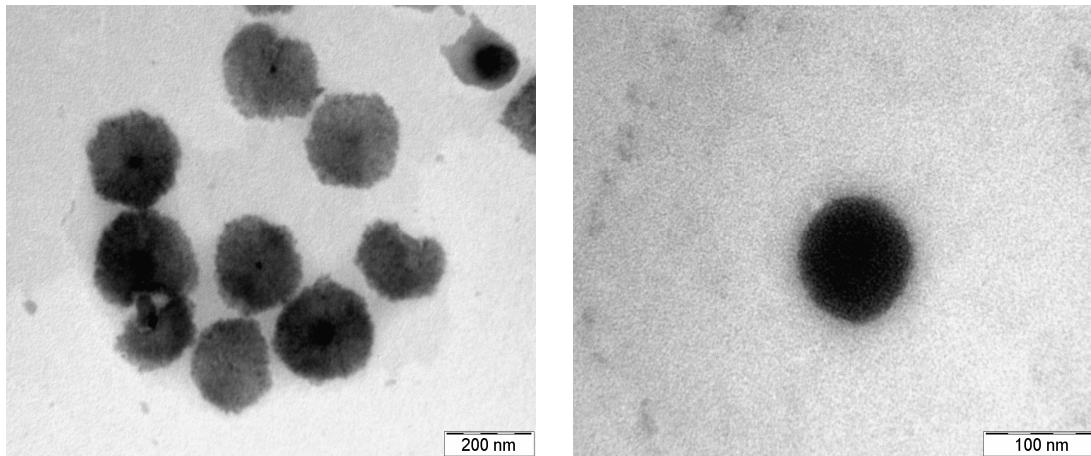


Figura 6

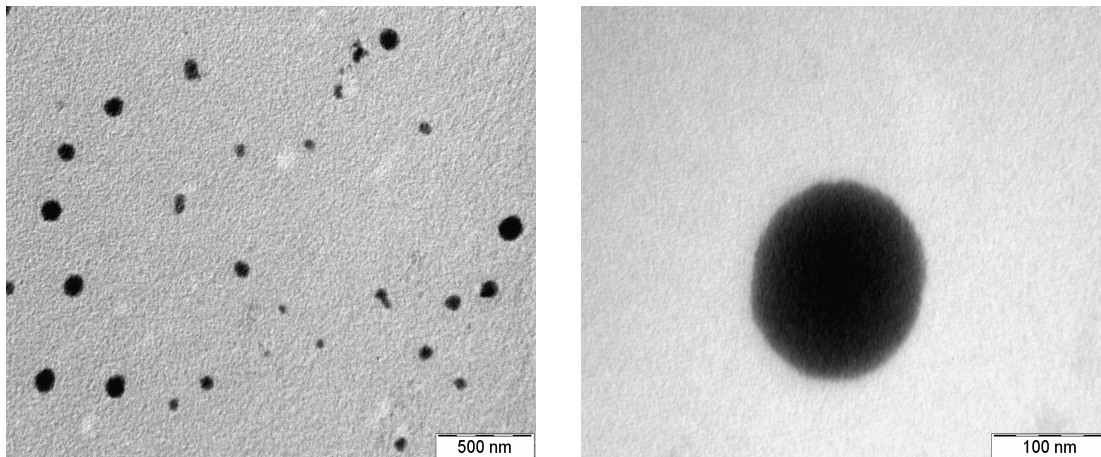


Figura 7

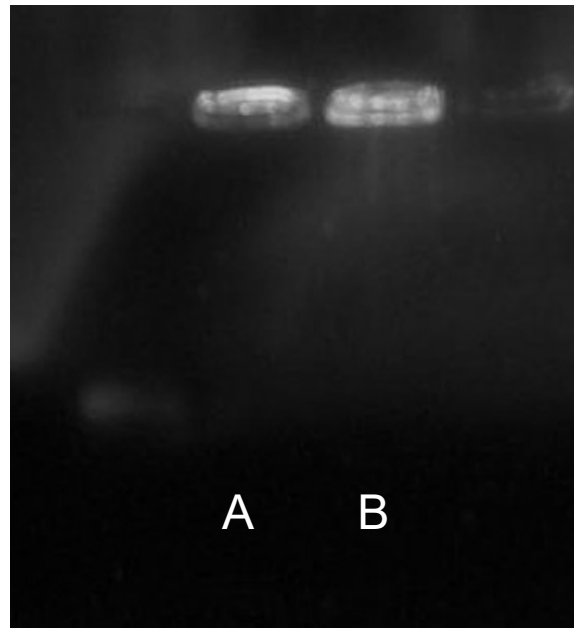


Figura 8

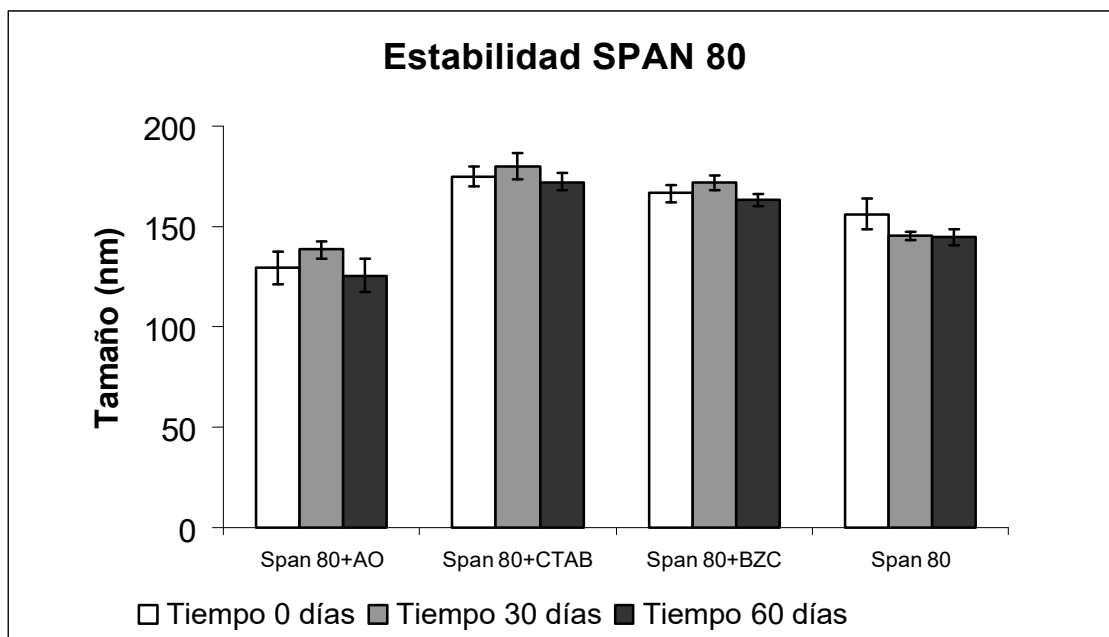


Figura 9

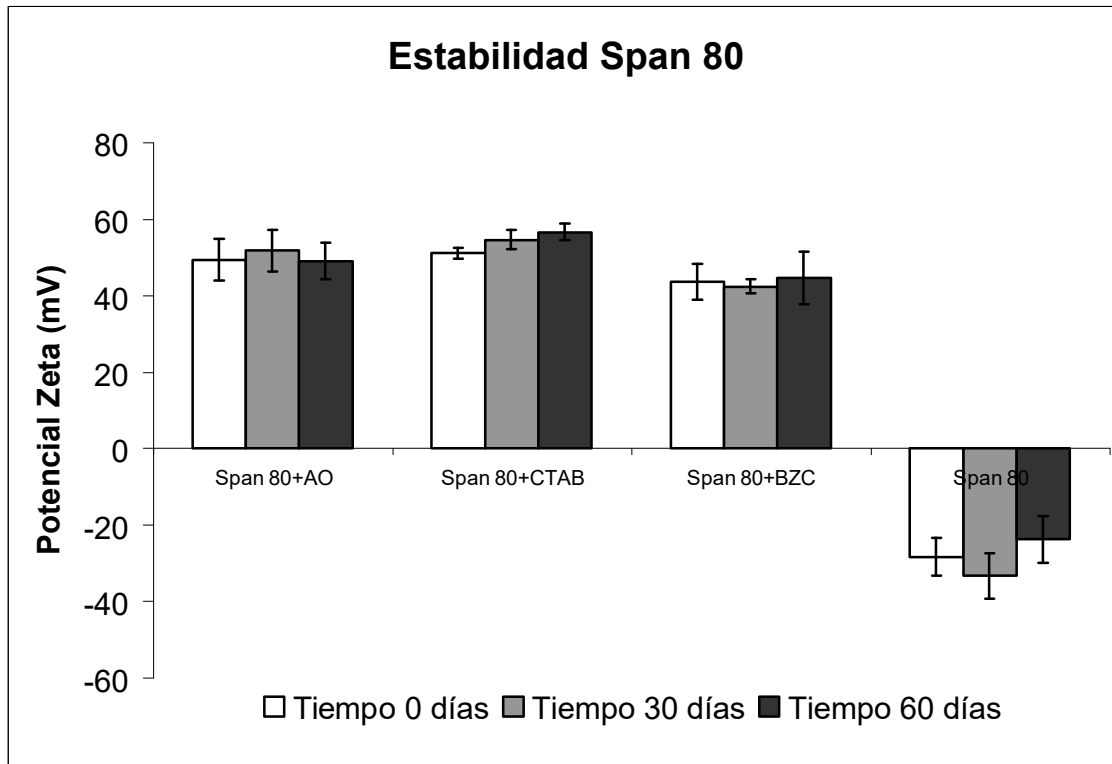


Figura 10

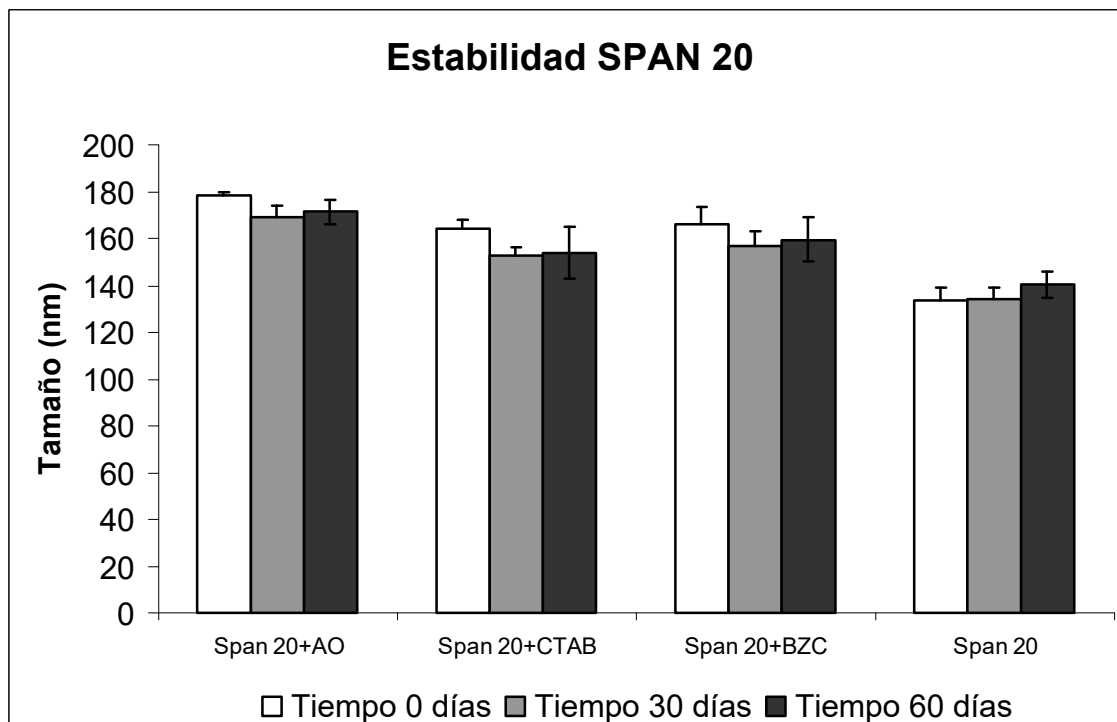


Figura 11

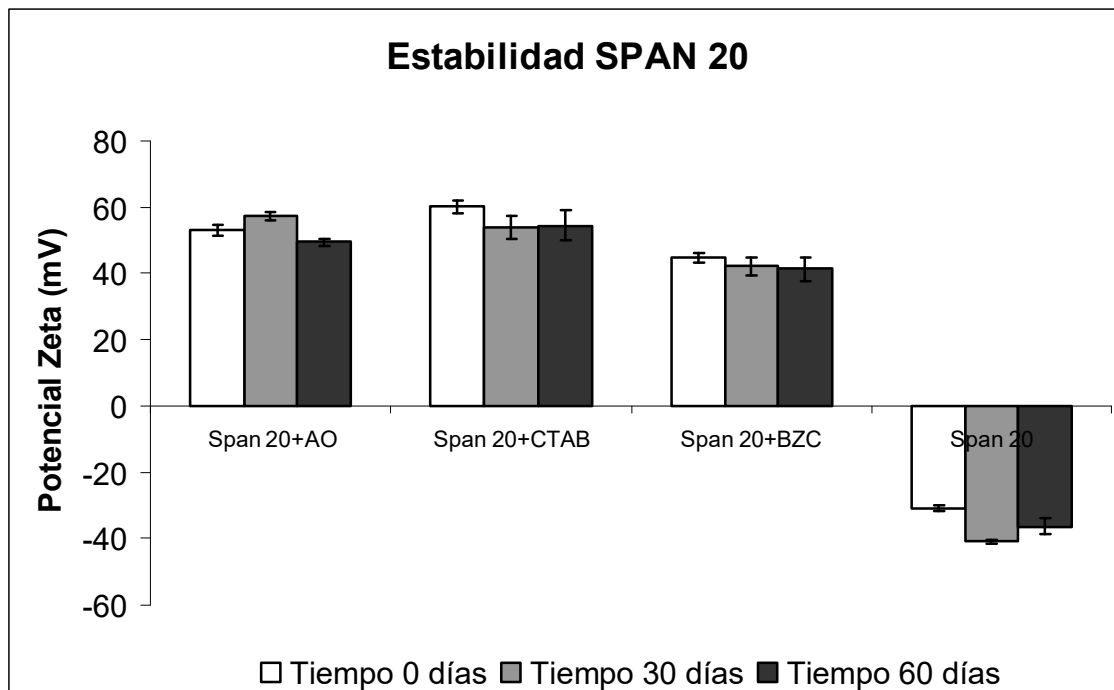


Figura 12



Figura 13

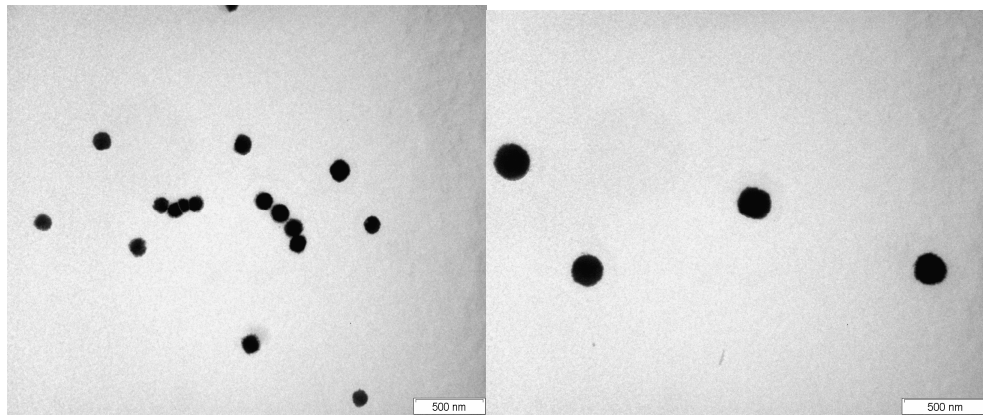


Figura 14

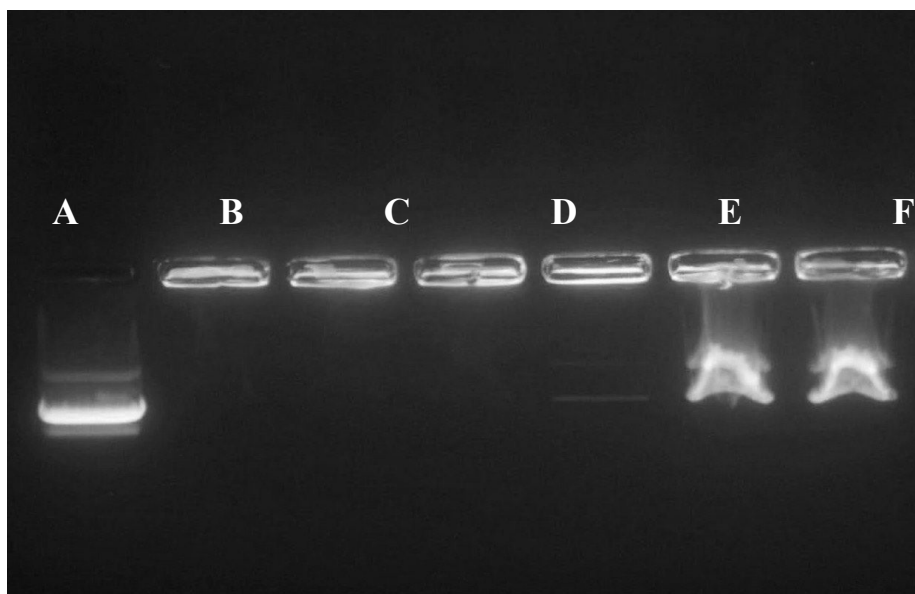


Figura 15

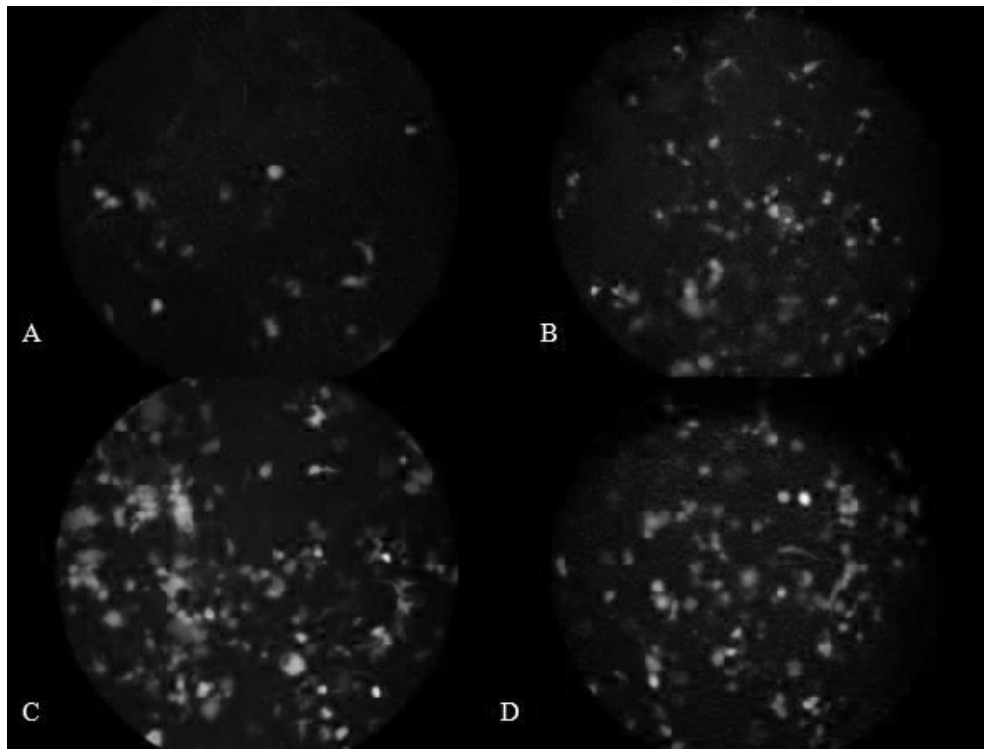


Figura 16

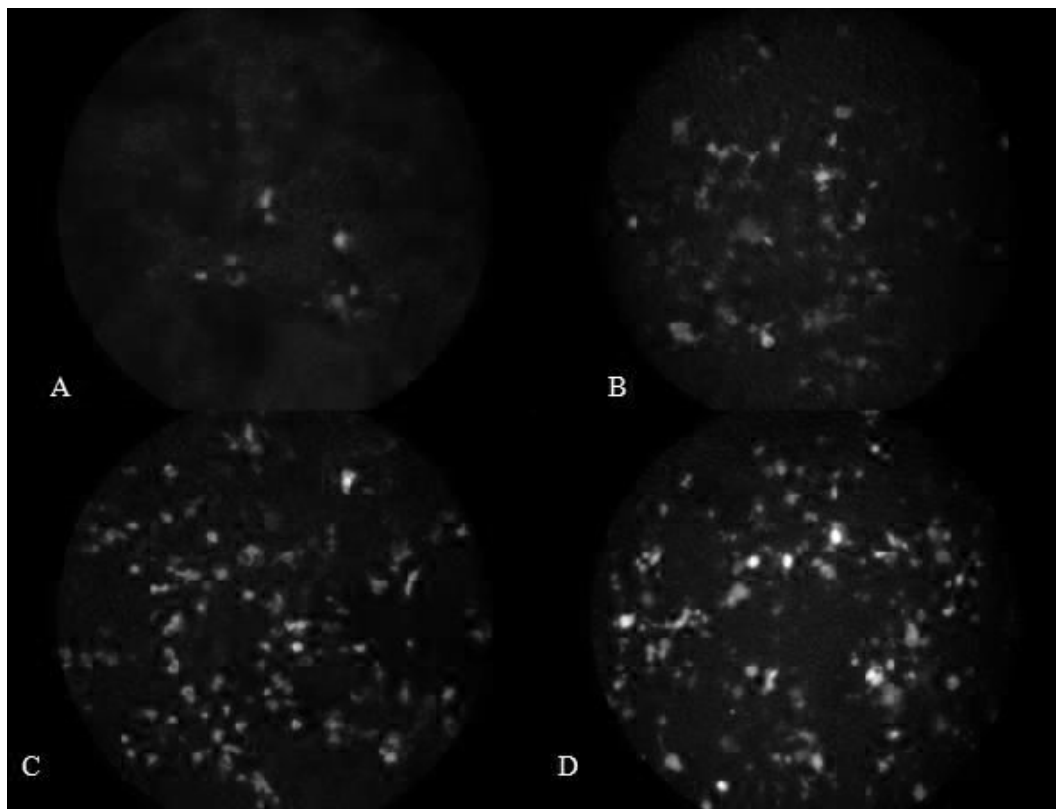


Figura 17

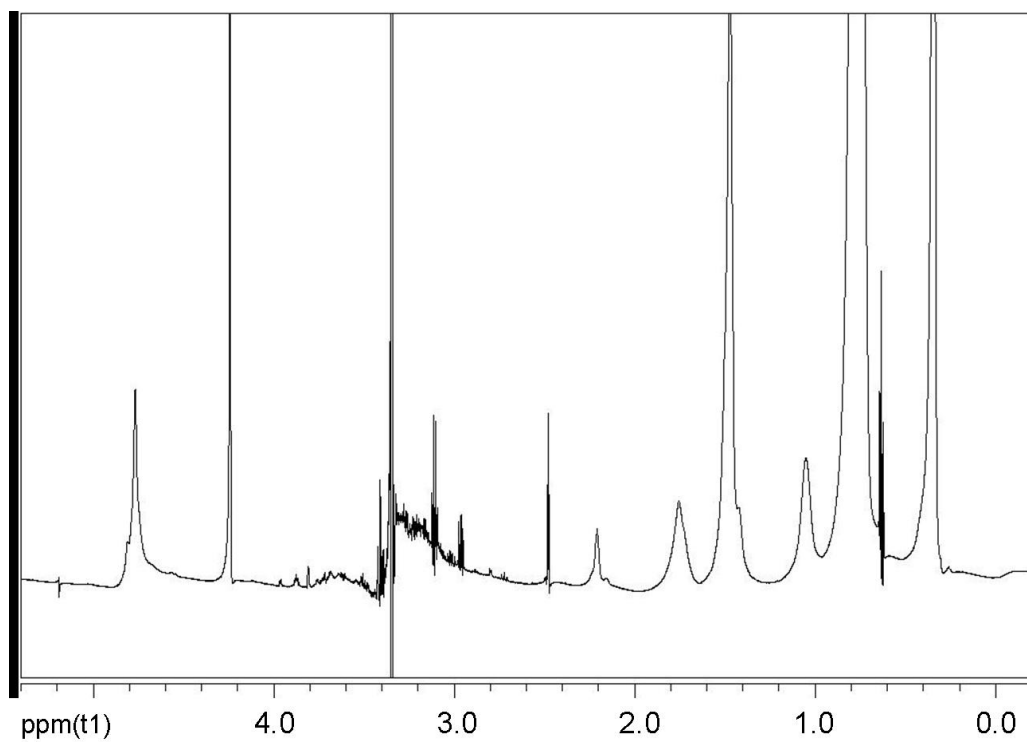
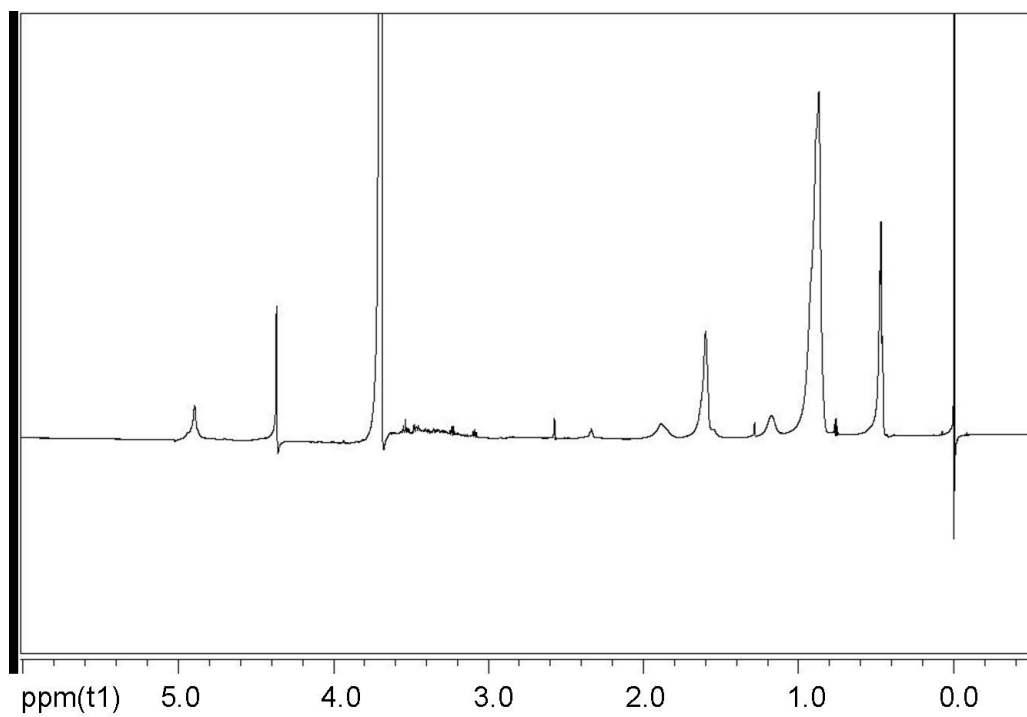


Figura 18

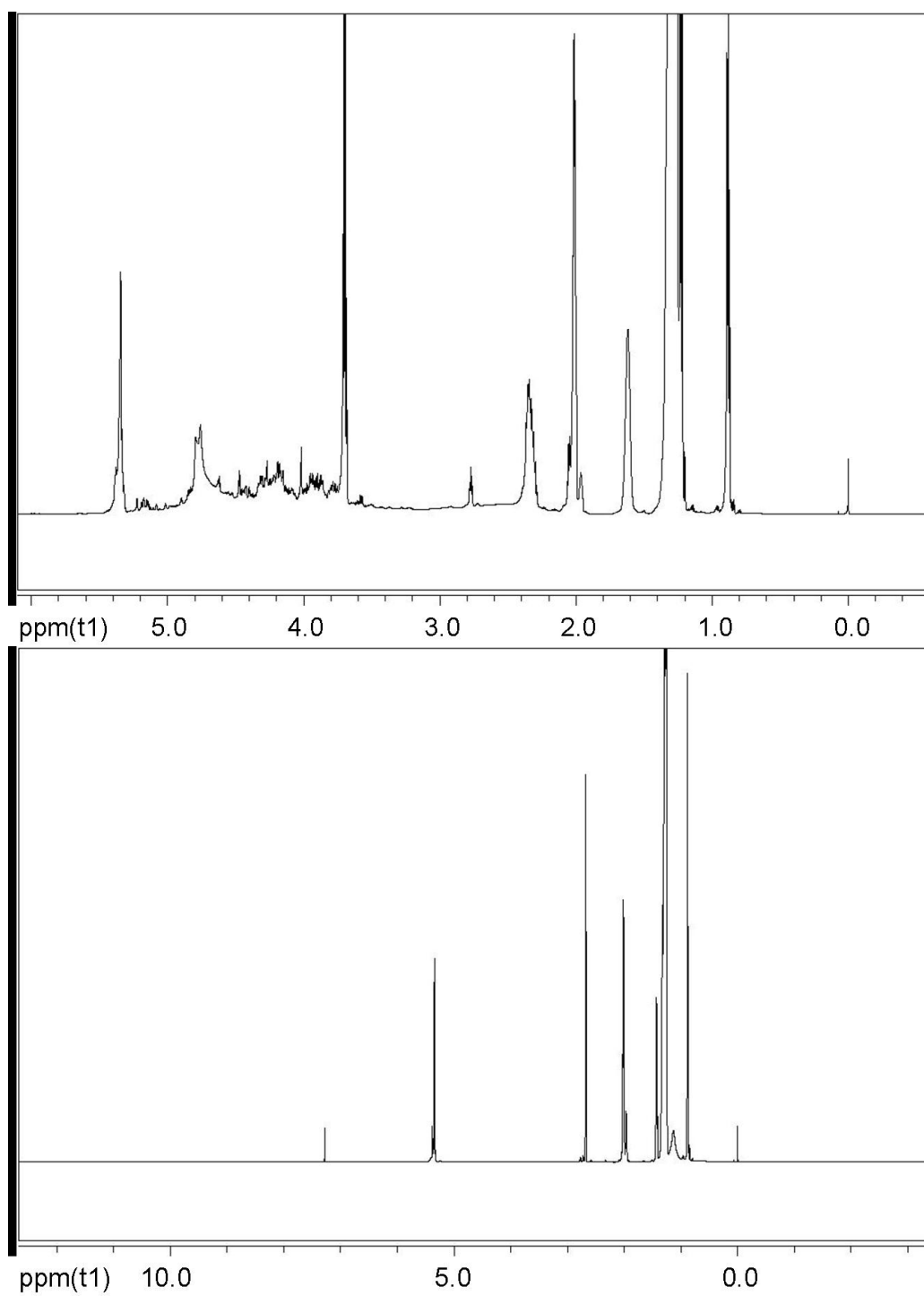


Figura 19

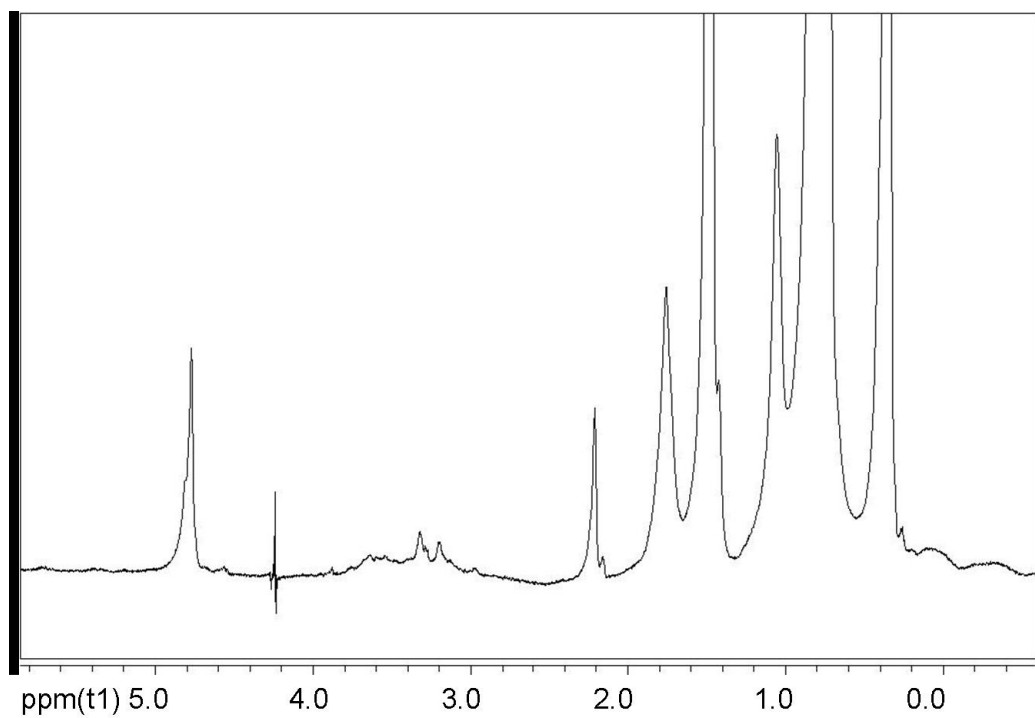
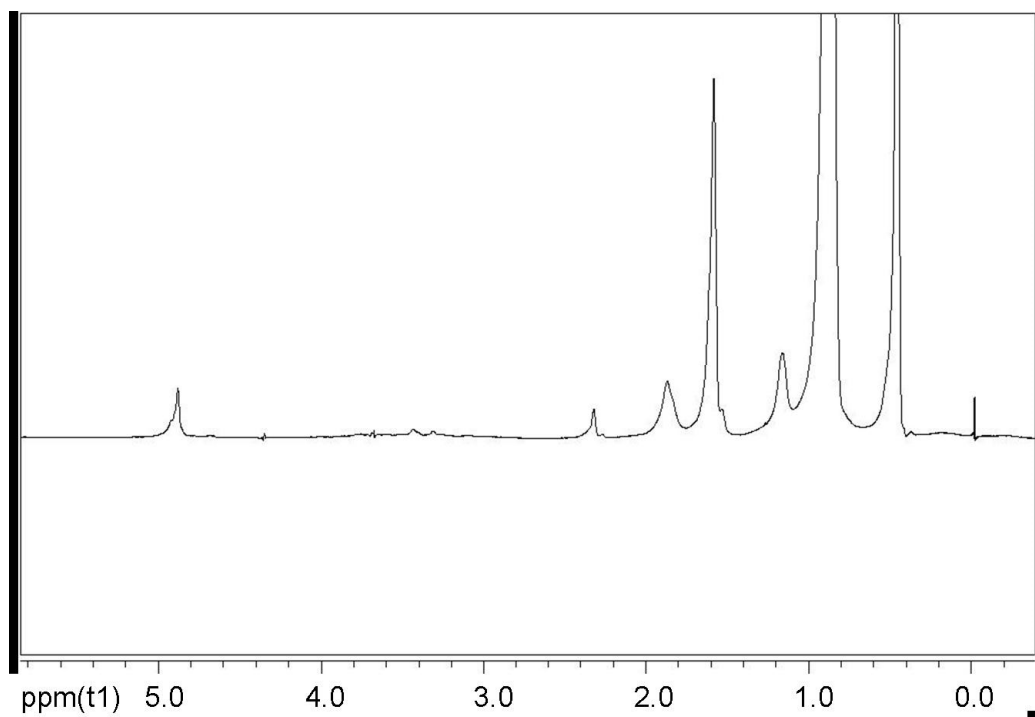


Figura 20

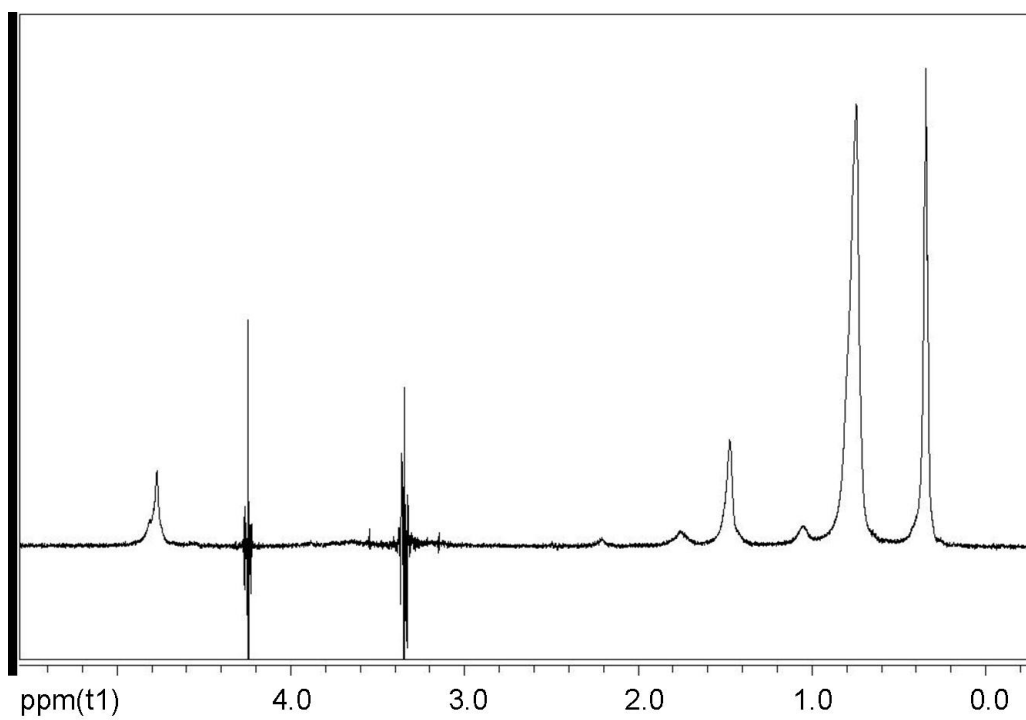
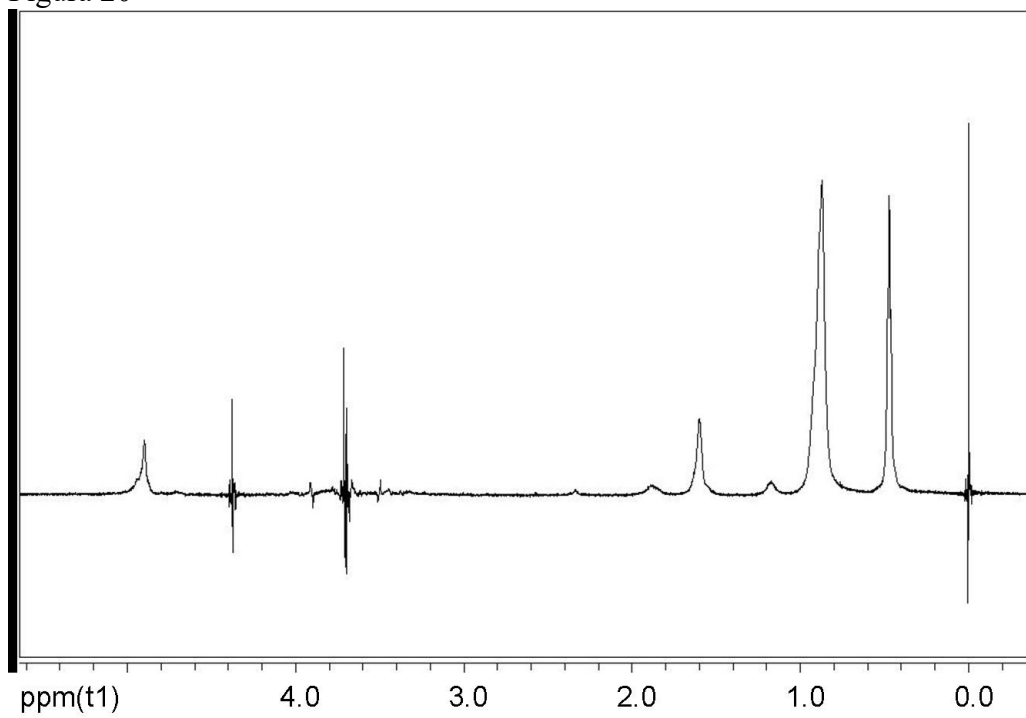


Figura 21

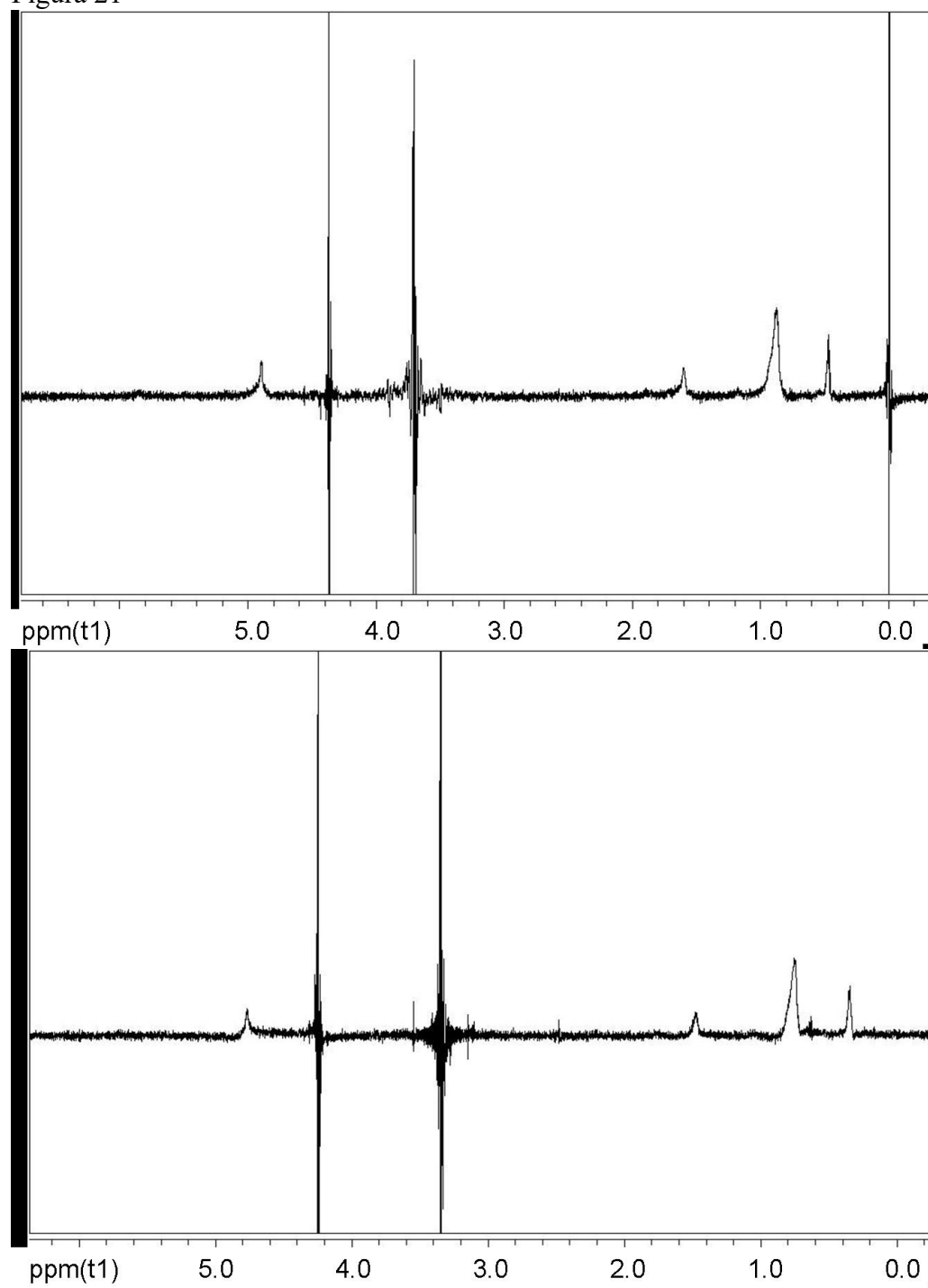


Figura 22

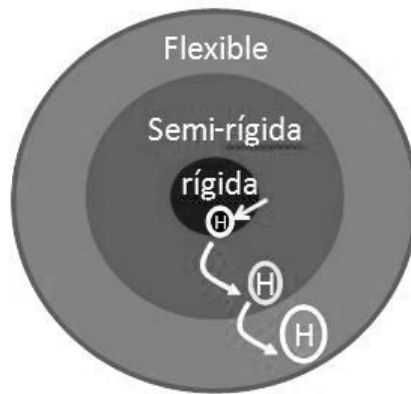


Figura 23

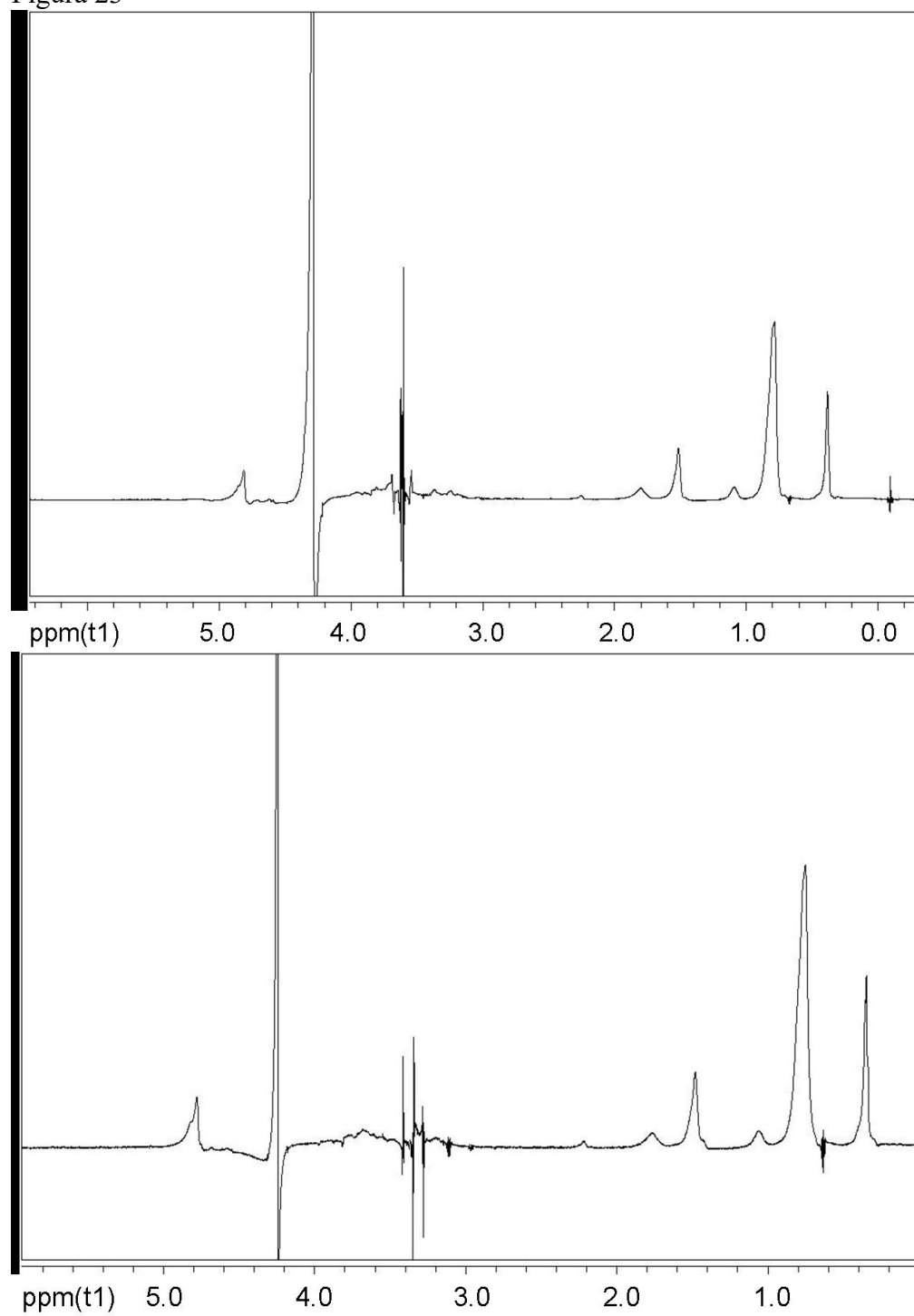


Figura 24

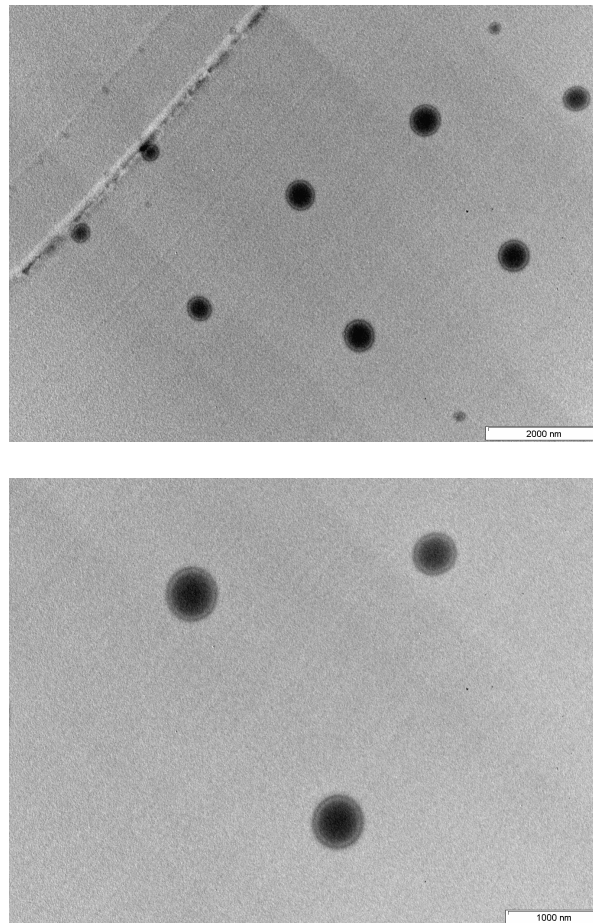


Figura 25

