



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① N.º de publicación: **ES 2 098 188**

② Número de solicitud: 9500907

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 9/51

A61K 47/36

A61K 47/32

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.05.95**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.97**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.97

⑦ Solicitante/s:

**Universidade de Santiago de Compostela
Centro de Transferencia de Tecnoloxia
Avda das Ciencias, s/n**

⑦ Inventor/es: **Alonso Fernández, María José;**

**Calvo Salve, Pilar;
Remuñán López, Carmen y
Vila Jato, José Luis**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Desarrollo de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos.**

⑤ Resumen:

Desarrollo de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos. Las nanopartículas (de tamaño nanométrico y carácter hidrofílico), también denominadas nanosferas o latexes, son sistemas coloidales formados por la combinación de dos polímeros de naturaleza hidrofílica. Los polímeros son el quitosano (un aminopolisacárido) y el poloxamer (un copolímero del óxido de etileno y del óxido de propileno). El procedimiento de obtención transcurre en fase acuosa sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos ni sustancias auxiliares de naturaleza tóxica. Las nanopartículas tienen aplicación como formas farmacéuticas (para la administración in vivo de ingredientes activos) debido a la capacidad para retener en su interior medicamentos y proteínas.

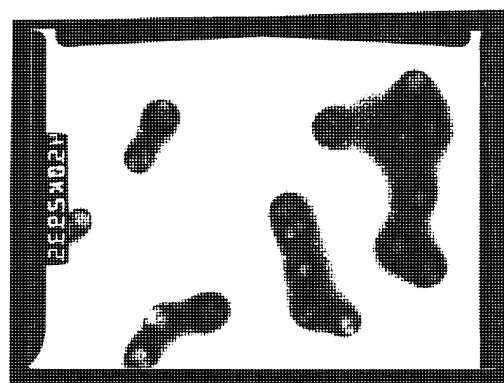


Figura 1

ES 2 098 188 A1

DESCRIPCION

Desarrollo de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos, para su aplicación como nuevas formas farmacéuticas, cuyos componentes principales son dos polímeros hidrofílicos, uno el quitosano (dotado de carga positiva) y otro el poloxamer (de carácter no iónico y propiedades tensoactivas). La carga eléctrica de las nanopartículas coloidales puede oscilar desde un valor positivo hasta un valor próximo a la neutralidad, dependiendo de la proporción relativa de ambos polímeros.

El quitosano (polímero de origen natural) que presenta estructura aminopolisacáridica y carácter catiónico, se obtiene mediante un proceso de deacetilación de la quitina (molécula que se extrae del caparazón de los crustáceos). El quitosano se comercializa con diferentes pesos moleculares y distinto grado de deacetilación bajo la forma de base o sal (clorhidrato o glutamato de quitosano).

El poloxamer (un copolímero sintético de óxido de etileno y óxido de propileno) presenta un carácter no iónico y está dotado de propiedades tensoactivas. El poloxamer (Pluronic F68, Synperonic F68) se comercializa por diferentes compañías con distintos pesos moleculares y diferente proporción de grupos etileno y propileno. Su utilización en la preparación de sistemas coloidales inyectables, principalmente la variedad que contiene un 80% de óxido de etileno, es frecuente debido a su ausencia de toxicidad.

Las nanopartículas de quitosano-poloxamer pueden llevar incorporados medicamentos y/o macromoléculas proteicas. El rendimiento de asociación es dependiente de la composición del sistema (relación de ambos polímeros) y de las propiedades fisicoquímicas de la molécula que se pretende asociar. En consecuencia sirven como formas de administración de las citadas moléculas.

Estas nuevas nanopartículas se preparan según un procedimiento extremadamente sencillo en el que no se requiere la utilización de disolventes orgánicos ni condiciones extremas de pH ni sustancias auxiliares de naturaleza tóxica. La formación de las nanopartículas tiene lugar debido a un proceso de precipitación conjunta del quitosano y del poloxamer en forma de nanoagregados poliméricos, causado por la adición de un agente de carácter básico como es el tripolifosfato.

El procedimiento de elaboración de los sistemas coloidales propuesto es diferente de otros procedimientos basados en la interacción iónica de dos macromoléculas hidrofílicas, como es el método de coacervación compleja (T. Takahashi, K. Takayama, Y. Machida and N. Nagai, "Chitosan-Alginate complex coacervate capsules: Effects of calcium chloride, Plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability", *Biotechnology Progress*, 4, 76-81 (1988)) o el método de complejación iónica (M. M. Daly and D. Knorr, "Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate", *Int. J. Pharm.* 61, 35-41 (1990)); estos métodos permiten, en el primer caso, la formación de microcápsulas y en el segundo la obtención de soluciones de complejos, siendo en ambos casos ne-

cesaria la interacción de dos especies de carga opuesta. Sin embargo, en las nanopartículas propuestas uno de los componentes, el poloxamer, carece de carga iónica. Además la precipitación conjunta de ambos polímeros no ocurre tras su puesta en contacto sino que se produce tras la incorporación al medio de un agente inductor de la reticulación y precipitación del quitosano. Por otro lado, una diferencia fundamental entre el procedimiento propuesto y cualquiera de los procedimientos previamente patentados de coacervación compleja radica en la formación de partículas con un tamaño submicroscópico (inferior a 1 μm).

Es de destacar el interés actual de las nanopartículas hidrofílicas, como lo demuestra la abundante literatura existente en este campo. Ciertamente, se han publicado numerosos trabajos que describen diversos métodos de elaboración de nanopartículas a base de macromoléculas de origen natural como son las proteínas albúmina (W. Lin, A. G. A. Coombes, M. C. Garnett, M. C. Davies, E. Stacht, S. S. Davis and L. Illum, "Preparation of sterically stabilized human serum albumin nanospheres using a novel dextranox-MPEG crosslinking agent", *Pharm. Res.*, 11, (1994) y gelatina (H. J. Watzke and C. Diechbourg, "Novel silica-biopolymer nanocomposites: the silica sol-gel process in biopolymer organogels", *Adv. Colloid Interface Sci.*, 50, 1-14 (1994) y polisacáridos como el alginato (M. Rajonarivony, C. Vauthier, G. Couarrage, F. Pui-sieux and P. Couvreur, "Development of a new drug carrier made from alginate", *J. Pharm. Sci.*, 82, 912-917 (1993)). Sin embargo, la mayoría de esos métodos requieren el uso de disolventes orgánicos, aceites, elevadas temperaturas y agentes reticulantes, aspectos que limitan enormemente la explotación de esos sistemas. Dentro de estos métodos, el más inocuo ha sido el propuesto para la elaboración de nanopartículas de alginato, basado en un proceso de gelificación iónica en presencia de calcio y posterior endurecimiento en presencia del polielectrolito catiónico poli-L-lisina. Estas nanopartículas presentan sin embargo los problemas relativos a la toxicidad sistémica y elevado coste de la poli-L-lisina.

Por otro lado, una reciente alternativa en el desarrollo de nanopartículas hidrofílicas ha consistido en el recubrimiento de nanopartículas de poliácido láctico con copolímeros del óxido de etileno y óxido de propileno en base a un proceso de adsorción (A. G. A. Coombes, P. D. Scholes, M. C. Davies, L. Illum and S. S. Davis "Resorbable polymeric microspheres for drug delivery-production and simultaneous surface modification using PEO-PPO surfactants", *Biomaterials*, 15, 673-680 (1994)) o bien a la elaboración de nanopartículas a base de copolímeros de ácido láctico y del polioxietileno (R. Gref, Y. Minimitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin and R. Langer, "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres", *Science*, 263, 1600 (1994)).

Sin embargo, los inconvenientes asociados a los sistemas ya descritos se centran en el hecho de que la proporción en la que el polímero hidrofílico (polioxietileno) se encuentra presente en estos sistemas es mínima con respecto a la

correspondiente al polímero base formador de la nanopartícula, normalmente poliácido láctico. Además para la elaboración de todos estos sistemas se requiere, como para los mencionados anteriormente, la utilización de disolventes orgánicos de naturaleza tóxica.

A pesar del esfuerzo por parte de numerosos investigadores en el desarrollo de nanopartículas hidrofílicas, en la bibliografía y revisión de patentes no se ha encontrado referencia alguna a la formación de nanopartículas cuyos componentes mayoritarios sean el quitosano y el poloxamer.

Con la presente invención se resuelven los problemas planteados en los desarrollos precedentes consiguiendo la formación de nanopartículas de extremado carácter hidrofílico y composición original mediante un procedimiento sencillo e inmediato, en el que no intervienen ingredientes tóxicos. Los componentes mayoritarios son dos polímeros hidrofílicos, en particular el quitosano y el poloxamer. La proporción de ambos componentes puede ser muy variable, pudiendo ser la proporción de uno de ellos 50 veces superior a la del otro.

Los sistemas coloidales o nanopartículas propuestos presentan numerosas ventajas sobre otros previamente descritos en trabajos publicados no únicamente desde un punto de vista preparativo o tecnológico, sino también desde la óptica de su interés como vehículos o sistemas transportadores de medicamentos administrables por todas las vías de administración actualmente concebidas. Las ventajas más relevantes incluyen: (1) el procedimiento de preparación es sencillo y no requiere la utilización de ingredientes tóxicos para el organismo tales como disolventes orgánicos y aceites, (2) las propiedades fisicoquímicas de estos sistemas, en concreto su tamaño, hidrofilia y carga superficial, son modulables en función de la relación de poloxamer/quitosano, (3) dichos sistemas pueden incluir en su estructura principios activos y/o macromoléculas de tipo proteico, y (4) dichos sistemas pueden actuar como vehículos transportadores de medicamentos después de su administración in vivo por diferentes vías.

Dentro de las vías para las que estos sistemas ofrecen interés destacan, por un lado, aquellas que conllevan el contacto del sistema con una superficie epitelial tales como la vía oral, transdérmica, ocular, nasal y vaginal, y por otro lado, aquellas que llevan asociada una inyección. En el primer caso, el contacto de estas partículas coloidales con el epitelio podrá verse favorecido dotando a las partículas de una importante carga positiva, lo que favorecerá su interacción con las citadas superficies mucosas cargadas negativamente. En el segundo caso, más en concreto para la administración intravenosa, estos sistemas ofrecen la posibilidad de modular la distribución in vivo de los fármacos o moléculas activas que llevan asociadas.

Así pues en la invención proveemos nuevos sistemas coloidales de interés en terapéutica y cosmética. Estos sistemas constituidos por una suspensión de nanopartículas pueden presentarse bajo una forma líquida de viscosidad variable. Las nanopartículas están constituidas a base de los polímeros poloxamer y quitosano (éste en forma base o sal). La proporción de ambos polí-

meros puede variar desde 1:1 hasta 1:50 (relación p/p quitosano/poloxamer).

A pesar de que es posible obtener nanopartículas formadas únicamente a base de quitosano, simplemente bajo la incorporación de iones negativos (como es el tripolifosfato) al medio acuoso ácido en el que se disuelve el quitosano, estas nanopartículas son irregulares. Por otro lado, la inclusión del polímero poloxamer en el sistema permite modular las características de las nanopartículas en términos de tamaño de partícula, potencial Z e hidrofilia, (como se puede observar en la Tabla 1).

Estos sistemas permiten la inclusión en su estructura de ingredientes activos de diferente naturaleza, siendo especialmente adecuados para la asociación de ingredientes hidrofílicos. Este aspecto ofrece extraordinario interés si tenemos en cuenta que la mayor parte de los sistemas coloidales patentados en la actualidad permiten únicamente la encapsulación de medicamentos y otros ingredientes de carácter lipofílico.

Como ingrediente activo se entiende aquél para el que se diseña la formulación, es decir aquél que ha de desempeñar una determinada función tras su administración a un organismo vivo. La función puede ser la de combatir, paliar o prevenir una enfermedad (vacunas, vitaminas....), mejorar el aspecto físico y estético (hidratación de la piel, prevención o facilitación de la caída del cabello) y similares.

Los sistemas coloidales cuya preparación describimos se caracterizan por presentar un tamaño de partícula inferior a $1\ \mu\text{m}$, por lo que se denominan nanopartículas. Se ha observado que las condiciones bajo las cuales se obtienen estas nanopartículas, en particular la concentración de quitosano requerida para su formación, es dependiente del peso molecular del mismo y de la forma base o sal en la que se encuentre dicho polímero. Por otro lado, el tamaño de las partículas es altamente dependiente de la concentración de quitosano en el medio acuoso en el que se desarrollan las nanopartículas, de hecho para concentraciones demasiado bajas (inferiores a 0,01% en fase acuosa) o demasiado elevadas (superiores a 0,5% en fase acuosa) se obtiene únicamente una solución o grandes partículas de elevado tamaño (superior a $1\ \mu\text{m}$), respectivamente. Además el tamaño de las nanopartículas se encuentra altamente influenciado por la concentración de poloxamer, con el que interacciona el quitosano. Por ejemplo, según se refleja en la Tabla 1, al variar la concentración de poloxamer desde un 0,5% hasta un 10% se produce un incremento apreciable del tamaño de partícula (desde 275 nm hasta 685 nm) y una reducción en el valor de potencial Z.

Utilizando la albúmina como proteína modelo, se ha puesto de manifiesto un elevado rendimiento de asociación de dicha molécula a las nanopartículas de poloxamer-quitosano, observándose que dicho rendimiento es dependiente de la concentración de la albúmina en el medio acuoso en el que se desarrollan las nanopartículas (Tabla 2). Igualmente se ha observado que la inclusión de la albúmina en las citadas nanopartículas no conduce a modificaciones importantes ni en el tamaño de partícula ni en el potencial Z.

En cuanto a la estructura interna de estas nanopartículas, estudios de microscopía electrónica sugieren la formación de un entramado polimérico más o menos compacto, dependiendo de la proporción en la que se encuentra el poloxamer. La Figura 1 es una microfotografía tomada en el microscopio electrónico de transmisión que muestra el aspecto de las nanopartículas compuestas de quitosanopoloxamer; amplificación: 42 K.

El procedimiento original permite preparar una nueva composición farmacéutica, dermatológica o cosmetológica que puede ser utilizada para la administración de ingredientes activos por diferentes vías, incluyendo tópica, oral, nasal, pulmonar, vaginal, ocular, subcutánea, intramuscular e intravenosa.

Aparecerán otras finalidades, características y ventajas de la invención a la luz de la descripción explicativa que sigue en la que se muestran ejemplos, simplemente a título ilustrativo y que en modo alguno pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas de quitosano

Se preparó una suspensión de nanopartículas de la siguiente composición (% p/p):

Quitosano	0,14 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

La preparación se llevó a cabo del modo siguiente:

Se prepararon 25 ml de una solución acuosa ácida (ácido acético 0,05 M) de quitosano al 0,2 % (p/v) ajustándola a pH 5. A continuación a dicha solución se incorporaron 10 ml de la solución de tripolifosfato (0,1 %) bajo agitación magnética a 100 rpm. La suspensión se mantuvo bajo agitación continua durante 30 minutos.

Una vez obtenidas las nanopartículas se determinó su tamaño de partícula y potencial Z, obteniendo unos valores para los citados parámetros 275 nm y 44 mV, respectivamente.

Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas de poloxamer 188-quitosano en proporción 5/1 (p/p).

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 1 pero conteniendo poloxamer 188. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente habiendo incorporado el poloxamer a la solución de quitosano.

Quitosano	0,14 %
Poloxamer 188	0,70 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula y potencial Z fueron 300 nm y 40,5 mV.

Ejemplo 3

Preparación de nanopartículas con una proporción poloxamer 188/quitosano 25/1 (p/p)

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 2 pero conteniendo una cantidad 5 veces superior de poloxamer 188. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente.

Quitosano	0,14 %
Poloxamer 188	3,50 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula y potencial Z fueron 430 nm y 27,99 mV.

Ejemplo 4

Preparación de nanopartículas con una proporción poloxamer 188/quitosano 50/1 (p/p)

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 2 pero conteniendo una cantidad 10 veces superior de poloxamer 188. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente.

Quitosano	0,14 %
Poloxamer 188	7,00 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula y potencial Z fueron 685 nm y 17,89 mV.

Ejemplo 5

Preparación de nanopartículas de quitosano-poloxamer cargadas de albúmina

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 2 pero introduciendo en el sistema albúmina del suero bovino como molécula modelo. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente.

Quitosano	0,14 %
Poloxamer 188	0,70 %
Albúmina	0,14 %
Tripolifosfato	0,10 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula y potencial Z fueron 368 nm y 46 mV. El porcentaje de albúmina asociada al quitosano fue del 21 %, lo cual representa un 21,6 % con respecto a la cantidad de quitosano.

Los valores de tamaño de partícula y potencial Z obtenidos para relaciones de poloxamer/quitosano intermedios se reflejan en la Tabla 1.

TABLA 1

Quitosano/Poloxamer 188 (p/p)	Tamaño (nm)*	Potencial Z (mV)#
1/0	275	43,96
1/2,5	283	41,24
1/5	300	40,54
125	430	27,99
150	685	17,89

* Determinado por espectroscopía de correlación fotónica

Determinado por dispersión de rayos laser

Los resultados de rendimiento de asociación de la albúmina a las nanopartículas de la compo-

sición anterior se reflejan en la Tabla 2.

TABLA 2

	Quitosano/Albúmina (p/p)	Tamaño (nm*)	Potencial Z (mV)#	% Asociado
5	10/1	402 ± 24	43 ± 3	80
	4/1	359 ± 35	45 ± 1	43
10	2/1	375 ± 26	45 ± 1	26
	1/1	368 ± 72	46 ± 2	21

* Determinado por espectroscopía de correlación fotónica

Determinado por dispersión de rayos laser

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Desarrollo de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos, para su aplicación como nuevas formas farmacéuticas, cuyos componentes principales son dos polímeros hidrofílicos, un aminopolisacárido y un derivado polioxietileno, ambos de naturaleza no tóxica. **Caracterizados** por su tamaño nanométrico (tamaño inferior a $1 \mu\text{m}$), su potencial Z positivo y su capacidad para incorporar ingredientes activos y proteínas.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el aminopolisacárido es el quitosano o cualquiera de sus derivados, en particular sales o ésteres.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el derivado polioxietileno es un copolímero del óxido de etileno y óxido de propileno, concretamente el poloxamer 188 (Pluronic F68, Synperonic F68).

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la concentración de quitosano con respecto a la fase acuosa total es de 0,05% a 0,20% (p/p) dependiendo del peso molecular del quitosano y de su forma base, sal o éster.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la concentración

de poloxamer con respecto a la fase acuosa total puede oscilar entre 0,5% y 7% (p/p), representando así el componente mayoritario del sistema.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque se introduce en la composición del sistema un ingrediente activo complementario, en particular la albúmina de suero bovino.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque se introduce la albúmina de suero bovino a concentraciones variables entre 0,014% y 0,14% con respecto a la composición total del sistema.

8. Procedimiento de obtención de una composición según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque dicha composición se prepara bajo una forma apropiada para su aplicación por vía oral, nasal, vaginal, pulmonar y tópica, presentando las partículas una elevada carga positiva que facilita su interacción con epitelios y mucosas.

9. Procedimiento de obtención de una composición según las reivindicaciones de 1 a 7, **caracterizado** porque dicha composición se prepara bajo una forma apropiada para su aplicación por vía parenteral, presentando dichas partículas un elevado contenido en poloxamer y una carga eléctrica próxima a la neutralidad.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

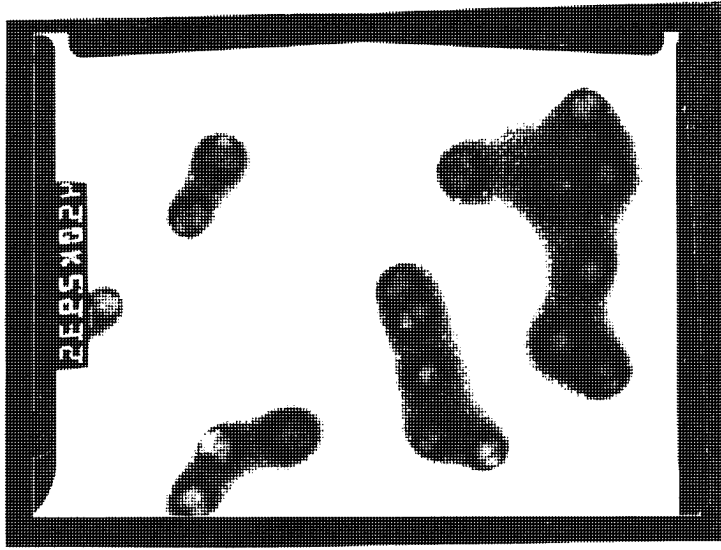


Figura 1



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K9/51, 47/36, 47/32

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	WO-96/20698-A (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 11.07.96 * reivindicaciones 1, 11, 30 y 32 *	1, 2 y 3
A	US-5071644-A (VIEGAS) 10.12.91 * todo el documento *	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
13.03.97

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1