



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 347 119**

② Número de solicitud: 200901098

⑤ Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **22.04.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**25.10.2010**

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

⑦ Inventor/es: **Lozano López, Victoria;**  
**Alonso Fernández, María José y**  
**Torres López, Dolores**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Nanocápsulas de poliarginina.**

⑤ Resumen:

Nanocápsulas de poliarginina.

La presente invención se refiere a un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas con un diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  que comprenden una sal de poliarginina, un fosfolípido negativo y un aceite. La invención también se relaciona con procedimientos para la obtención de dicho sistema de nanocápsulas, sus composiciones farmacéuticas y cosméticas, así como el uso del mismo en medicina, particularmente en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

ES 2 347 119 A1

## DESCRIPCIÓN

Nanocápsulas de poliarginina.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas de tamaño nanométrico, dichos ingredientes activos son tanto de carácter hidrofílico como hidrofóbico, así como a las composiciones farmacéuticas y cosméticas que comprenden los mismos y procedimientos para su elaboración.

**Antecedentes de la invención**

Las propiedades físico-químicas de los principios activos son características determinantes en el desarrollo farmacéutico de estas moléculas y que además pueden condicionar su eficacia terapéutica. Más concretamente, la baja solubilidad en agua de muchos principios activos dificulta su formulación requiriendo en ocasiones la utilización de excipientes que pueden causar serios efectos secundarios así como de complicaciones en el tratamiento. Por otro lado, las moléculas hidrofílicas y de gran tamaño presentan dificultades en el paso de las barreras biológicas y ven comprometida su estabilidad por la degradación debida a los mecanismos de defensa del organismo. Estas dificultades han de ser solventadas para lograr que las moléculas activas accedan a la diana terapéutica y conseguir de este modo una terapia efectiva.

La incorporación de ingredientes activos en sistemas de tamaño nanométrico ha ayudado a mejorar las limitaciones de formulación que presentan estas moléculas, incrementando adicionalmente su potencial en terapéutica. Mejoras en la solubilidad, protección frente a la degradación o mayor penetración de los ingredientes activos son algunas de las ventajas que ofrece la nanoencapsulación de moléculas activas.

Es también conocido que la capacidad de estos sistemas para atravesar las barreras externas y acceder al interior del organismo depende tanto de su tamaño como de su composición. Partículas de pequeño tamaño aumentarán el grado de transporte respecto a las de un mayor tamaño: los nanosistemas, de diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , responden a este criterio. Si se elaboran a partir de polímeros de origen natural, biocompatibles y biodegradables, incrementan las posibilidades de que los nanosistemas sean transportados a través de las mucosas del organismo de forma natural, mediante mecanismos de transporte conocidos y sin alterar la fisiología de los epitelios.

La lecitina es una sustancia de origen natural cuyo componente principal es la fosfatidilcolina (fosfolípido de carácter neutro) y cuyos componentes secundarios son el fosfatidilinositol, el ácido fosfatídico (fosfolípidos de carga negativa), otros fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina y la lisofosfatidilcolina, y otros componentes como tocoferol o triglicéridos.

La poliarginina (PArg) es un poliaminoácido hidrofílico y catiónico que mantiene su carga positiva en casi la totalidad del rango de pH debido al fuerte carácter alcalino de sus grupos guanidino. Este homopolímero se encuentra incluido dentro de la familia de los llamados dominios transductores de proteínas (PTD, protein transduction domains). Los PTD son moléculas que han demostrado su capacidad para atravesar eficazmente las membranas biológicas y tras su modificación química han sido utilizados para aumentar la captación celular de proteínas y de moléculas de mayor tamaño. De este modo, los estudios clínicos llevados a cabo para la obtención de una vacuna para la hepatitis C compuesta por el poliaminoácido poliarginina como inmunoadyuvante, muestran el incremento de la respuesta inmune por parte de las células T sin observarse antigenicidad por parte del polímero (Mattner *et al.* Cáncer Res. (2002) 62:1477). Esta capacidad de internalización también ha sido utilizada en terapia génica en la modificación de liposomas para la vehiculización de siRNA obteniéndose elevados niveles de transfección (Zhang *et al.* J. Control. Release. (2006) 112(2):229).

Asimismo, diversos estudios demuestran la capacidad promotora de la absorción de la poliarginina para el paso de marcadores fluorescentes a través de la mucosa nasal (Miyamoto *et al.* Eur. J. Pharm. Biopharm (2001) 52(1):21), del péptido natriurético auricular o de la calcitonina (Natsume *et al.* Drug Deliv. Syst. (1999) 14:21). En el documento US2003215491 también se describe la capacidad de la poliarginina como promotor de la absorción por vía nasal de moléculas bioactivas mediante la formación de matrices lipídicas constituidas por fosfolípidos o por aceites.

En el documento US005716614A1 se utiliza también la combinación de ácidos grasos con poliarginina para la formación de sistemas de liberación de moléculas activas como micelas, vesículas o liposomas dirigidos al sistema nervioso central.

Otros sistemas formulados a partir de poliarginina son los divulgados en los documentos US2006269606 y WO2006116546, en los que se describe la formación de microcápsulas formadas por un núcleo recubierto por el poliaminoácido poliarginina para la vehiculización de moléculas activas. En este punto es conveniente resaltar que las técnicas de microencapsulación destinadas a la formación de micropartículas o microcápsulas difieren generalmente de las nanotecnologías aplicadas a la formación de nanosistemas. Asimismo, los sistemas coloidales obtenidos por ambos procesos presentan características muy diferentes no sólo en relación a su tamaño, sino también respecto al comportamiento de los mismos y posterior aplicación.

Por otro lado, la arginina es ampliamente conocida como precursor del óxido nítrico, importante agente vasodilatador; por lo que la poliarginina ha sido utilizada como agente terapéutico para el recubrimiento de implantes cardiovasculares. De este modo, en el documento US2006062821 se describe la formulación de núcleos poliméricos recubiertos con poliarginina para la obtención de emulsiones recubiertas, microsferas o liposomas destinados a la formación de dispositivos implantables en cardiología.

Así pues, existe la necesidad creciente de proporcionar sistemas de liberación de ingredientes activos alternativos a los existentes en la actualidad. Particularmente, sería conveniente disponer para determinadas aplicaciones de nanosistemas estables, que fueran aptos para encapsular moléculas de distinta solubilidad y que además presentaran buenas propiedades de adsorción e internalización en las superficies biológicas.

### Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema de nanocápsulas de fácil obtención mediante distintos procedimientos experimentales, en donde las nanocápsulas comprenden poliarginina en forma de sal, y un núcleo oleoso, que comprende a su vez un aceite y un componente fosfolipídico con carácter negativo. Dichos sistemas de nanocápsulas permiten una eficaz asociación de ingredientes activos, independientemente de su hidrofili- cedad/hidrofobicidad, y la consiguiente liberación en el medio adecuado. El tamaño reducido de dichas nanocápsulas, diámetro inferior a  $1\ \mu\text{m}$ , posibilita su paso a través de mucosas y que sean internalizadas por las células. Asimismo, la presencia de un recubrimiento de poliarginina facilita su absorción y otorga estabilidad a las nanocápsulas, además de conferir una carga superficial altamente positiva, que permite la interacción con superficies biológicas del organismo cargadas negativamente, como son las mucosas o las células tumorales.

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas con un diámetro inferior a  $1\ \mu\text{m}$  que comprenden una sal de poliarginina, un fosfolípido negativo y un aceite.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los sistemas definidos anteriormente.

En otro aspecto, la invención hace referencia a una composición cosmética que comprende los sistemas definidos anteriormente.

Asimismo, la invención se refiere al uso de dichos sistemas en la preparación de un medicamento. En una realización particular, dicho uso está relacionado con el tratamiento del cáncer.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un procedimiento para la obtención de los sistemas definidos anteriormente, que comprende:

- a) preparar una disolución acuosa de una sal de poliarginina;
- b) preparar una disolución orgánica de un fosfolípido negativo y un aceite;
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas; y
- d) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

Según realizaciones particulares, la encapsulación de un ingrediente activo se lleva a cabo por adición a la etapa a) o a la etapa b) o bien una vez formadas las nanocápsulas, dependiendo de la solubilidad de dicho ingrediente activo.

En una realización más particular, un ingrediente activo hidrofóbico, se añade a la disolución orgánica de la etapa b). En otra realización más particular, si el ingrediente activo es hidrófilo se añade preferentemente disuelto en agua en la etapa b). Según otra realización particular, para incorporar un ingrediente activo hidrofílico, se puede hacer mediante incorporación del mismo a las nanocápsulas obtenidas en la etapa d).

En otro aspecto adicional, la invención se dirige a un procedimiento para la obtención de los sistemas definidos anteriormente, que comprende recubrir una nanoemulsión, constituida al menos por un fosfolípido negativo, un aceite y una fase acuosa, con una sal de poliarginina mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa de una sal de poliarginina.

Según una realización particular, el procedimiento además comprende añadir un ingrediente activo.

Según una realización más particular, en caso de que el ingrediente activo tenga un carácter hidrofílico, dicho ingrediente activo se añade a la nanoemulsión, preferentemente disuelto en agua. Según otra realización más particular, en caso de que el ingrediente activo tenga un carácter hidrofóbico, dicho ingrediente activo se añade en el proceso de formación de la nanoemulsión, preferentemente disuelto en etanol.

Según otra realización particular, el ingrediente activo se incorpora mediante adsorción a las nanocápsulas previamente formadas.

Según realizaciones particulares de los procedimientos anteriores, se añade un componente auxiliar a la disolución preparada en la etapa b) o a la nanoemulsión, el cual será preferiblemente un derivado hidrófobo de polioxitileno, y más preferiblemente estearato de polietilenglicol. Este componente auxiliar permite modular la carga eléctrica superficial de las nanocápsulas del sistema, así como aportarles un escudo protector para mejorar su estabilidad en fluidos biológicos.

## 10 Descripción de las figuras

Figura 1: Imágenes de TEM de sistemas de nanocápsulas de poliarginina (PArg) al 3 y al 6% p/p, respectivamente.

Figura 2: Evaluación del grado de asociación de pADN a los sistemas de nanocápsulas (NCs) de poliarginina mediante electroforesis a distintas relaciones de carga (3, 10 y 30%). Los sistemas estudiados fueron:

- pADN libre
- Sistemas de nanocápsulas de poliarginina/pADN
- Sistemas de nanocápsulas de poliarginina/pADN + heparina

Figura 3: Tamaño de los complejos de ADN/poliarginina en agua y en tampón fosfato.

Figura 4: Evaluación del grado de asociación de pADN a los sistemas de nanocápsulas de pADN/poliarginina, a los sistemas de nanocápsulas de pADN/poliarginina-PEG y a los complejos pADN/poliarginina.

Figura 5: Perfil de liberación de docetaxel (DCX) de sistemas de nanocápsulas de poliarginina.

Figura 6: Evaluación del tamaño de partícula de la formulación de sistemas de nanocápsulas de poliarginina del 3% p/p durante su almacenamiento a 4°C y 37°C (tamaño (nm) vs tiempo (meses)).

Figura 7: Evaluación del tamaño de partícula de la formulación de sistemas de nanocápsulas de poliarginina del 6% p/p durante su almacenamiento a 4°C y 37°C (tamaño (nm) vs tiempo (meses)).

Figura 8: Evaluación del efecto del crioprotector trealosa (al 5 y al 10% p/v) sobre el tamaño de partícula de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina (al 3 y al 6% p/p) tras el proceso de liofilización.

Figura 9: Estudio de la capacidad de inhibición de la proliferación celular de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina. Se representa el % de viabilidad celular a diferentes concentraciones de DCX para NC de poliarginina, DCX en disolución, NC de poliarginina/DCX.

Figura 10: Estudio de la captura celular de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina. Valores obtenidos de entrada celular de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina en comparación con la nanoemulsión y el marcador fluorescente libre.

Figura 11: Estudio de la captura celular de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina dependiendo de la cantidad de poliarginina en el nanosistema. Valores obtenidos de entrada celular de las formulaciones de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina 3 y 6% p/p.

## 50 Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a la elaboración de sistemas de nanocápsulas para la administración de ingredientes activos, en donde las nanocápsulas del sistema tienen un diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  y comprenden una sal de poliarginina, un fosfolípido negativo, y un aceite.

La interacción electrostática que se produce entre la forma protonada positivamente de la poliarginina con el fosfolípido negativo da lugar a la formación de los sistemas de nanocápsulas. Es importante destacar la diferencia existente entre los sistemas de nanocápsulas y sistemas de nanoemulsiones, ya que la ventaja de las los sistemas de nanocápsulas con respecto a los sistemas de nanoemulsiones es la presencia de un polímero recubriendo los núcleos oleosos de las nanocápsulas que les puede conferir propiedades mucoadhesivas, promotoras de la absorción o de protección frente a la agregación. Estos sistemas de nanocápsulas presentarán además ventajas respecto a otros sistemas de mayor tamaño (micropartículas, pellets, films, esponjas...) en cuanto a sus aplicaciones biológicas. De hecho, se sabe que la interacción de un sistema de liberación de fármacos con una superficie biológica está altamente condicionada por su tamaño. Así, las nanocápsulas son capaces de atravesar mucosas y de ser internalizadas por las células actuando como sistemas de transporte de fármacos, mientras que las micropartículas no tienen esa capacidad. Igualmente, la biodistribución de estos sistemas está altamente condicionada por el tamaño. El conocimiento generado en los últimos años

en el mundo de los sistemas coloidales de liberación de fármacos ha permitido fijar una frontera claramente definida entre los nanosistemas (inferiores a una micra) y los sistemas microparticulares.

5 Asimismo, es importante destacar la diferencia entre los sistemas de nanocápsulas y “complejos”. Se entiende por “complejos” la nanoestructura formada por la interacción de polielectrolitos o bien por polielectrolitos y tensioactivos de carga opuesta. Los sistemas de nanocápsulas de la presente invención se diferencian de los complejos de poliarginina (Kim *et al.* Mol. Ther. (2006) 14:343) por tratarse de un sistema transportador nanocapsular que aporta mayor homogeneidad al sistema, así como la posibilidad de coencapsular en el núcleo otros componentes como por ejemplo principios activos o excipientes. Estas características permiten mantener la integridad y funcionalidad de la nanoestructura así como aportar mayor estabilidad en presencia de fluidos biológicos.

15 Las nanocápsulas de los sistemas de la presente invención presentan un diámetro medio inferior a 1  $\mu\text{m}$ , respondiendo por tanto a la definición de nanosistema, sistema coloidal constituido a base de polímeros con un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , es decir, tienen un tamaño de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 50 y 500 nm. El tamaño de las nanocápsulas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación y puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental a continuación. El tamaño de las mismas no varía notoriamente al modificar la relación de poliarginina en la formulación, obteniéndose en todos los casos sistemas de tamaño nanométrico.

20 La carga superficial de las nanocápsulas de poliarginina presenta valores altamente positivos, siendo un aspecto importante ya que frecuentemente interesa para obtener mayor interacción con las superficies biológicas del organismo, y particularmente con las mucosas o con células tumorales, cuya superficie es más negativa en relación a las células sanas. Por tanto, la carga positiva de las nanocápsulas favorece la interacción con superficies biológicas y, como consecuencia, se verá favorecido que los ingredientes activos asociados al sistema de nanocápsulas de poliarginina actúen sobre los tejidos diana.

En una realización particular, la sal de poliarginina se selecciona entre clorhidrato, bromhidrato, acetato y sulfato. De forma preferida la sal de poliarginina es clorhidrato.

30 En la presente invención, el término “fosfolípido negativo” alude a un componente fosfolipídico que comprende un único fosfolípido cargado negativamente o una mezcla de fosfolípidos cuya carga global es negativa, como es el caso de algunos fosfolípidos de origen natural, tal como la lecitina. En una realización particular, el fosfolípido negativo se selecciona entre lecitina, fosfatidil glicerol, fostatidil serina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y ácido fosfatídico. De forma preferida el fosfolípido negativo es lecitina.

35 En otra realización particular, el aceite se selecciona entre aceite de cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma; vitamina E, miristato de isopropilo, escualeno, Mygliol<sup>®</sup>, Labrafil<sup>®</sup>, Labrafac<sup>®</sup>, Peceol<sup>®</sup> y Maisine<sup>®</sup>. De forma preferida el aceite es Mygliol<sup>®</sup>.

40 El término “ingrediente activo” se refiere a cualquier sustancia 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. El ingrediente activo podrá ser por ejemplo un fármaco, una vitamina, una vacuna, etc., o un agente cosmético. Los sistemas de nanocápsulas objeto de la presente invención son adecuados para incorporar ingredientes activos independientemente de las características de solubilidad de los mismos. La capacidad de asociación dependerá de la molécula incorporada, pero en términos generales será elevada tanto para moléculas hidrófilas, como para las de marcado carácter hidrófobo. En una realización particular, el ingrediente activo se selecciona entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos como oligonucleótidos, polinucleótidos o bien combinaciones de las moléculas citadas.

50 En una realización preferida, el ingrediente activo es docetaxel. En otra realización preferida, el ingrediente activo se selecciona entre un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido, ARN de interferencia, un plásmido de ADN o un polinucleótido, preferentemente el ingrediente activo es un plásmido de ADN.

55 La proporción de ingrediente activo incorporado en el sistema puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 50% en peso con respecto al peso total de los componentes del sistema. 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. En una realización particular, la proporción de principio activo puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 10% en peso, preferentemente hasta aproximadamente el 5%.

60 En el caso específico de incorporar como principio activo un polinucleótido tal como un plásmido de ADN o ARN de interferencia, la proporción del mismo en dicho sistema puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 30% en peso, preferiblemente hasta aproximadamente el 10%.

65 En una realización particular, los sistemas definidos anteriormente pueden incorporar en su estructura capsular un componente auxiliar que mejore su estabilidad en fluidos biológicos y reduzca su captura por parte del sistema inmune (sistema fagocítico mononuclear). Este componente auxiliar será preferiblemente un derivado hidrófobo de polioxietileno, y más preferiblemente es estearato de polietilenglicol.

## ES 2 347 119 A1

El procedimiento de obtención de los sistemas de nanocápsulas es un método sencillo que evita condiciones drásticas como altas temperaturas. Además, tampoco es necesario llevar a cabo ningún tipo de reacción química para la obtención de los mismos, ya que según se ha indicado el procedimiento de obtención del sistema es mediante interacción iónica. Por tanto, se preserva así la integridad de las moléculas incorporadas al sistema, susceptibles de ser degradadas. Para lograr la formación de nanocápsulas en un rango de tamaños deseado, se procede a la formación de los núcleos oleosos constituidos por el aceite y recubiertos por el fosfolípido negativo, simultáneamente se produce la interacción electrostática entre el fosfolípido y el poliaminoácido poliarginina que conducirá a la obtención de las nanocápsulas de poliarginina. Se trata, por tanto, de un proceso de emulsificación-difusión de solventes, que ocurre de manera controlada y proporcionará estabilidad al sistema, sin que exista la necesidad de creación de enlaces covalentes entre los componentes.

Un procedimiento particular para la obtención de los sistemas de la invención comprende:

- a) preparar una disolución acuosa de una sal de poliarginina;
- b) preparar una disolución orgánica de un fosfolípido negativo y un aceite;
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas; y
- d) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

Los sistemas de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento alternativo que comprende recubrir una nanoemulsión con una sal de poliarginina mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa del polímero.

En una realización particular el proceso de incubación comprende mezclar la nanoemulsión con una disolución acuosa de poliarginina. En una realización más particular, el proceso de incubación comprende mezclar la nanoemulsión con una disolución acuosa de poliarginina en una proporción preferida 4:1 (nanoemulsión:disolución de PArg), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento.

Dicha nanoemulsión está constituida al menos por un fosfolípido negativo, un aceite y una fase acuosa. La fase acuosa es preferentemente agua bidestilada, si bien puede contener agentes tensoactivos, sales, y otros agentes auxiliares.

Los procedimientos de preparación de dicha nanoemulsión son conocidos en el estado del arte, y pueden comprender un proceso de difusión, sonicación u homogeneización (Prego *et al.* J. Nanosci. Nanotechnol. (2006) 6:1; Tadros *et al.* Adv. Colloid Interface Sci. (2004) 109:303).

Un procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión comprende:

- i) preparar una disolución orgánica de un fosfolípido negativo y un aceite;
- ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa en agitación para formar una nanoemulsión;
- iii) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Otro procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión comprende:

- i) preparar una disolución orgánica de un fosfolípido negativo y un aceite;
- ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa y sonicar durante aproximadamente 1 minuto;
- iii) diluir aproximadamente 1:10 con agua la emulsión obtenida en la fase ii)
- iv) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Otro procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión comprende:

- i) preparar una disolución orgánica de un fosfolípido negativo y un aceite;
- ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa y homogeneizar durante aproximadamente 5 minutos;

## ES 2 347 119 A1

- iii) diluir aproximadamente 1:8 con agua la emulsión obtenida en la fase ii) y homogeneizar durante aproximadamente 10 minutos;
- iv) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

5

Según una realización particular de los procedimientos anteriores, un componente auxiliar constituido por un derivado hidrófobo de polioxietileno, se añade a la disolución de la etapa b) o a la etapa i). De forma preferida, el componente es estearato de polietilenglicol. En una realización más preferida, el estearato de polietilenglicol se encuentra en una relación aproximada de entre el 1 y 2% p/v (peso de estearato de polietilenglicol/volumen de formulación).

10

Según realizaciones particulares de los procedimientos anteriores, si el ingrediente activo es hidrofóbico, dicho ingrediente activo se añade a la disolución orgánica de la etapa b) o de la etapa i). De manera preferida, dicho ingrediente activo hidrofóbico se añade disuelto en etanol. Según otras realizaciones particulares, si el ingrediente activo es hidrofílico, dicho ingrediente activo se añade a la disolución de la etapa b) o de la etapa i). De manera preferida, dicho ingrediente activo hidrófilo se añade disuelto en una disolución acuosa. También es posible incorporarlo mediante adsorción a la suspensión de nanocápsulas obtenidas en la etapa d) o tras el proceso de incubación una vez formadas las nanocápsulas.

15

La formación de las nanocápsulas se produce al mezclar volúmenes de las soluciones mencionadas en diferentes proporciones. De este modo, las nanocápsulas tendrán una composición constante respecto a los núcleos oleosos, variando la relación de poliarginina aproximadamente entre el 1 y el 27% p/p (peso de poliarginina/peso de formulación). De forma preferida, la disolución acuosa de una sal de poliarginina está compuesta por 0,1-60 mg de poliarginina.

20

El disolvente de la disolución orgánica es preferentemente una mezcla de etanol/acetona, aún más preferentemente en una proporción aproximada de entre 1/15 y 1/20, u otros disolventes orgánicos como diclorometano. En una realización particular, sobre la disolución del fosfolípido se adiciona el aceite.

25

Un ejemplo particular para la obtención de los sistemas de nanocápsulas de la invención siguiendo el primer procedimiento descrito anteriormente comprende:

30

- a) preparar una disolución acuosa de una sal de poliarginina de 10 ml de volumen en los que se disuelve de 1 a 30 mg de poliarginina;
- b) preparar una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,7 ml) de lecitina (20 mg) y opcionalmente estearato de PEG (48-96 mg), a la que se le adiciona 62,5  $\mu$ l de Miglyol® 812. En esta etapa se puede incorporar, si se desea, un ingrediente activo hidrófilo disuelto en un pequeño volumen de fase acuosa (25  $\mu$ l);
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) opcionalmente, evaporar los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

35

40

45

El procedimiento de elaboración de los sistemas de nanocápsulas de poliarginina puede incluir una etapa adicional de liofilización, con el fin de preservarlos durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales. Para la liofilización de los sistemas es necesaria la adición de azúcares que ejerzan efecto crioprotector. Entre los azúcares útiles para llevar a cabo la liofilización se encuentran por ejemplo trealosa, glucosa, sucrosa, manitol, maltosa, polivinil pirrolidona (PVP). En forma liofilizada, las nanocápsulas pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo, y ser fácilmente regeneradas, en caso necesario, simplemente añadiendo un volumen de agua óptimo.

50

De acuerdo con esta etapa adicional, la presente invención se refiere también a los sistemas de nanocápsulas de poliarginina bajo forma de liofilizado.

55

Los sistemas de nanocápsulas aquí descritos presentan una estabilidad adecuada tanto en suspensión como bajo forma de liofilizado, por lo que pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo. Por otra parte, también ha sido estudiada su estabilidad en determinados fluidos biológicos lo cual garantiza que tras su administración a organismos, humano o animal, permanecerán bajo forma nanocapsular.

60

Los sistemas de nanocápsulas de poliarginina de esta invención presentan ventajas en comparación con otros sistemas de administración y/o liberación de fármacos, dado que presentan mejor estabilidad en fluidos biológicos en comparación con otros nanosistemas, como por ejemplo frente a complejos. La encapsulación de principios activos, como pADN, en las nanocápsulas de poliarginina aquí descritas, es preferible frente a los complejos de pADN/poliarginina por la mejora en la estabilidad del sistema. Además, la existencia de un transportador nanocapsular aporta una mayor homogeneidad al sistema, así como la posibilidad de coencapsular en el núcleo de la nanocápsula otros componentes, como principios activos, o bien excipientes.

65

Los sistemas de nanocápsulas de la invención, que comprenden poliarginina en su composición, han demostrado poseer excelentes propiedades promotoras de la absorción debido a la gran capacidad de internalización celular que presenta dicho poliaminoácido, lo cual las convierte en sistemas de gran utilidad como sistemas farmacéuticos y cosméticos.

Así, la invención en una realización particular se refiere a una composición farmacéutica, que comprende los sistemas de nanocápsulas anteriores, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En particular, la incorporación de ingredientes activos en las nanocápsulas de la invención origina sistemas, cuyas características determinadas en cuanto a su composición, propiedades y morfología, les confieren un elevado potencial en el campo de la terapéutica. El ingrediente activo a incorporar en los sistemas de la invención será aquél con propiedades farmacoterapéuticas adecuadas de acuerdo con la aplicación terapéutica a la cual sea destinada la formulación. En una realización particular, el ingrediente activo se selecciona entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos como oligonucleótidos, polinucleótidos o bien combinaciones de las moléculas citadas.

En una realización preferida, el ingrediente activo es docetaxel. En otra realización preferida, el ingrediente activo se selecciona entre un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido, ARN de interferencia, un plásmido de ADN o un polinucleótido, preferentemente el ingrediente activo es un plásmido de ADN.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por diferentes vías, tales como a través de mucosas, tópica o parenteralmente, y entre ellas resulta de elevado interés la administración a través de mucosas.

La proporción de principio activo incorporado en los sistemas puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 50% en peso con respecto al peso total de los componentes del sistema de nanocápsulas. 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. En una realización particular, la proporción de principio activo puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 10% en peso, preferentemente hasta aproximadamente el 5%.

En el caso específico de incorporar como principio activo un polinucleótido tal como un plásmido de ADN o ARN de interferencia, la proporción del mismo en dicho sistema puede llegar hasta aproximadamente el 30% en peso, preferiblemente hasta aproximadamente el 10%.

Debido a sus buenas propiedades para la administración sobre o a través de la piel, y a su estabilidad duradera, el sistema de nanocápsulas de la invención también es adecuado para aplicaciones cosméticas. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se dirige a una composición cosmética que comprende los sistemas de nanocápsulas previamente descritos, junto con uno o más excipientes cosméticamente aceptables. Las composiciones cosméticas según la invención incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de nanocápsulas) o cualquier composición que esté en la forma de gel, crema, pomada o bálsamo para su administración por vía tópica. Dicha composición cosmética puede ser aplicada a diversas partes superficiales del cuerpo humano o animal tal como la piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos, y a dientes o mucosas del cuerpo humano o animal. En una realización particular de la invención, la composición cosmética tiene una finalidad higiénica o de estética, o se emplea para neutralizar o eliminar ectoparásitos, o con el fin de perfumar, modificar el aspecto de la piel y/o corregir olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

En una variante de la invención, la composición cosmética también puede incorporar ingredientes activos de naturaleza lipófila e hidrófila que, aunque no tengan ningún efecto terapéutico, tienen propiedades como agente cosmético. Entre los ingredientes activos que pueden incorporarse en los sistemas de nanocápsulas pueden citarse agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes antiseborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, enzimas, sustancias de fragancia, entre otros.

Tal como se ha descrito anteriormente, cabe la posibilidad de que los sistemas de nanocápsulas descritos en la presente invención incorporen más de un ingrediente activo, que podrán estar disueltos en la misma disolución o por separado, dependiendo esto de la naturaleza de las moléculas a incorporar, evitando que exista ningún tipo de interacción, bien sea química o física, entre ellos.

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 los siguientes ejemplos se emplearán una serie de abreviaturas:

PArg = poliarginina

Nanocápsulas de PArg = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden PArg, Miglyol® 812 y lecitina.



## ES 2 347 119 A1

Nanocápsulas de PArg-PEG = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden PArg, Miglyol<sup>®</sup> 812, lecitina y estearato de PEG. DCX = docetaxel

pADN = ácido desoxirribonucleico plasmídico

La sal de PArg utilizada en los siguientes ejemplos fue el clorhidrato de poli-L-arginina de peso molecular entre 5000 y 15000 Da.

### Ejemplo 1

*Evaluación de las características físico-químicas de las nanocápsulas de PArg y nanocápsulas de PArg-PEG en función de la cantidad de polímero*

#### Ejemplo 1.1.

Se prepararon nanocápsulas constituidas por unos núcleos oleosos recubiertos de PArg según el *procedimiento de difusión de disolvente en una etapa*:

- a) se preparó una disolución acuosa de clorhidrato de PArg (10 ml) en la que se disuelve de 1 a 30 mg de PArg;
- b) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,7 ml) de lecitina (20 mg) a la que se le adiciona 62,5  $\mu$ l de Miglyol<sup>®</sup> 812. Opcionalmente, en esta etapa se puede incorporar estearato de PEG (48-96 mg) para dar lugar a las nanocápsulas de PArg-PEG 1 y 2% p/v respectivamente;
- c) se mezclaron bajo agitación magnética durante 5 minutos las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Cuando en la realización de este procedimiento las nanocápsulas estaban constituidas por 2,5 y 5 mg de clorhidrato de PArg, se obtuvieron las nanocápsulas de PArg al 3 y 6% p/p respectivamente.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta) y se tomaron fotos de las nanocápsulas mediante microscopía electrónica de transmisión. En la tabla 1 y figura 1 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PArg en la disolución acuosa de la etapa a).

TABLA 1

Formulación	PArg etapa a) (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NCs PArg	1	167 $\pm$ 1	0,01	+35 $\pm$ 1
NCs PArg-PEG 1% p/v	1	150 $\pm$ 2	0,09	+25 $\pm$ 1
NCs PArg-PEG 2% p/v	1	117 $\pm$ 1	0,12	+27 $\pm$ 1
NCs PArg	2,5	137 $\pm$ 11	0,13	+ 50 $\pm$ 6
NCs PArg	5	145 $\pm$ 13	0,10	+ 53 $\pm$ 6
NCs PArg	25	120 $\pm$ 2	0,11	+61 $\pm$ 1
NCs PArg	30	199 $\pm$ 1	0,54	+56 $\pm$ 2
NCs PArg-PEG 1% p/v	30	122 $\pm$ 4	0,37	+43 $\pm$ 2
NCs PArg-PEG 2% p/v	30	111 $\pm$ 2	0,11	+41 $\pm$ 3

#### Ejemplo 1.2.

Se prepararon nanocápsulas constituidas por unos núcleos oleosos recubiertos de PArg según el *procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas*:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,7 ml) de lecitina (20 mg) a la que se le adiciona 62,5  $\mu$ l de Miglyol<sup>®</sup> 812. Opcionalmente se puede incorporar estearato de PEG (48-96 mg) para dar lugar a las nanocápsulas de PArg-PEG 1 y 2% p/v respectivamente;
- ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de agua bidestilada bajo agitación magnética manteniéndose durante 5 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión;

## ES 2 347 119 A1

- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante;
- iv) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por 0,1 a 60 mg de PArg, en una proporción 4:1 (nanoemulsión:disolución de PArg), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PArg en la etapa iv).

Cuando en la realización de este procedimiento las nanocápsulas estaban constituidas por 2,5 y 5 mg de clorhidrato de PArg, se obtuvieron las nanocápsulas de PArg al 3 y 6% p/p respectivamente.

TABLA 2

Formulación	PArg etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	135 ± 4	0,16	-59 ± 2
NE-PEG 1% p/v	-	119 ± 3	0,12	-24 ± 3
NE-PEG 2% p/v	-	140 ± 2	0,08	-12 ± 2
NCs PArg	0,05	156 ± 9	0,15	-52 ± 2
NCs PArg-PEG 1% p/v	0,05	108 ± 3	0,11	-8 ± 5
NCs PArg-PEG 2% p/v	0,05	135 ± 2	0,08	+3 ± 1
NCs PArg	0,6	165 ± 3	0,16	+44 ± 2
NCs PArg	5	158 ± 2	0,12	+54 ± 3
NCs PArg	10	161 ± 1	0,16	+55 ± 1
NCs PArg	30	334 ± 4	0,42	+54 ± 1
NCs PArg-PEG 1% p/v	30	120 ± 1	0,16	+28 ± 2
NCs PArg-PEG 2% p/v	30	136 ± 1	0,08	+28 ± 1

Ejemplo 1.3.

Se prepararon nanocápsulas constituidas por unos núcleos oleosos recubiertos de PArg según el *procedimiento de sonicación*:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (20 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 62,5 µl de Miglyol® 812;
- ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua bidestilada y se sonicó durante 1 minuto;
- iii) se diluyó la emulsión obtenida con agua (dilución 1:10);
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante para formar una nanoemulsión; y
- v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por 0,1 a 60 mg de clorhidrato PArg, en una proporción 4:1 (nanoemulsión:disolución de PArg), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PArg en etapa v).

TABLA 3

Formulación	PArg etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	192 ± 9	0,09	-50 ± 7
NCs PArg	0,05	238 ± 14	0,18	-53 ± 3
NCs PArg	0,6	212 ± 10	0,17	+49 ± 1
NCs PArg	5	224 ± 6	0,13	+60 ± 1
NCs PArg	10	204 ± 2	0,14	+65 ± 1
NCs PArg	30	248 ± 4	0,19	+60 ± 1

## ES 2 347 119 A1

### Ejemplo 1.4.

Se prepararon nanocápsulas constituidas por unos núcleos oleosos recubiertos de PArg según el *procedimiento de homogeneización*:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (20 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 62,5  $\mu$ l de Miglyol<sup>®</sup> 812;
- ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua bidestilada y se homogeneizó a 16.000 rpm durante 5 minutos y posteriormente a 19.000 rpm durante otros 5 minutos;
- iii) se diluyó la emulsión obtenida con agua (dilución 1:10) y se homogeneizó durante 3 minutos a 22.000 rpm;
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante para formar una nanoemulsión; y
- v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por 0,1 a 60 mg de clorhidrato PArg, en una proporción 4:1 (nanoemulsión:disolución de PArg), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PArg en la etapa v).

TABLA 4

Formulación	PArg etapa v) (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	230 $\pm$ 7	0,19	-53 $\pm$ 5
NCs PArg	0,05	343 $\pm$ 37	0,26	-41 $\pm$ 3
NCs PArg	0,6	292 $\pm$ 5	0,24	+48 $\pm$ 2
NCs PArg	5	253 $\pm$ 36	0,19	+60 $\pm$ 2
NCs PArg	10	228 $\pm$ 3	0,19	+64 $\pm$ 1
NCs PArg	30	248 $\pm$ 4	0,45	+63 $\pm$ 5

### Ejemplo 2

*Evaluación de la capacidad de encapsulación de material genético en nanocápsulas de PArg*

Se prepararon nanocápsulas de PArg en forma de clorhidrato y un núcleo oleoso compuesto por lecitina y Miglyol<sup>®</sup> 812, según el procedimiento previamente descrito en el ejemplo 1.1. Se procedió a la asociación de una macromolécula hidrofílica cargada negativamente tomando como modelo pADN. La incorporación del ingrediente activo se llevó a cabo mediante la adsorción del material genético disuelto en una fase acuosa sobre una suspensión de nanocápsulas de PArg previamente aisladas.

La asociación de pADN sobre las nanocápsulas de PArg se puede realizar a diferentes relaciones de carga de material genético/nanocápsulas. Para el pADN y la PArg utilizados en el presente estudio se encontró que las relaciones óptimas eran del 3 y 10% (pADN/NC PArg). En la Tabla 5 se recogen los datos correspondientes al diámetro medio, índice de polidispersión y carga superficial de las nanocápsulas que incorporan pADN.

TABLA 5

	Tamaño (nm)	PI	Potencial zeta (mV)
NC PArg	123 $\pm$ 7	0,20	+56 $\pm$ 2
3% pADN/NC PArg	129 $\pm$ 4	0,22	+47 $\pm$ 2
10% pADN/NC PArg	136 $\pm$ 9	0,16	+31 $\pm$ 6

## ES 2 347 119 A1

Para las distintas proporciones de pADN/NC PArg ensayadas según el procedimiento de la invención se determinó cualitativamente la eficacia de asociación (evaluando el pADN libre mediante electroforesis). En las relaciones del 3 y 10% se observó una total asociación del pADN a las nanocápsulas, no detectándose la presencia de plásmido libre en el gel. Además, se observó que dicha interacción era muy fuerte, siendo necesaria la adición de elevadas concentraciones de heparina (15 mg/ml) para conseguir el desplazamiento del pADN (figura 2). Para la relación del 30% se observó una asociación significativa aunque también se detectó la presencia de plásmido libre en el gel. Así pues la relación del 3% fue la seleccionada para el resto de los estudios con pADN.

A continuación se evaluó el potencial de las nanocápsulas de PArg como sistemas para la vehiculización de pADN en comparación con los complejos pADN/PArg previamente descritos en la literatura (Rudolph *et al.* J. Biol. Chem. (2003) 278(13):11411). Para ello se preparó una serie de complejos pADN/PArg de relaciones de peso 5:1-1:5. Los valores de diámetro medio, índice de polidispersión así como de carga eléctrica superficial (potencial zeta) de los complejos se encuentran recogidos en la tabla 6.

TABLA 6

Formulación	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
<b>Complejos 5:1</b>	<b>176 ± 63</b>	<b>0,32</b>	<b>-11 ± 2</b>
<b>Complejos 3:1</b>	<b>101 ± 42</b>	<b>0,24</b>	<b>-12 ± 2</b>
<b>Complejos 1:1</b>	<b>79 ± 13</b>	<b>0,21</b>	<b>+19 ± 3</b>
<b>Complejos 1:3</b>	<b>150 ± 77</b>	<b>0,31</b>	<b>+14 ± 1</b>
<b>Complejos 1:5</b>	<b>132 ± 20</b>	<b>0,28</b>	<b>+9 ± 1</b>

Como se observa en la figura 3, los complejos de pADN/PArg presentan tamaños inferiores a 200 nm cuando se encuentran suspendidos en agua. Sin embargo, tras su dilución en tampón fosfato se produce la agregación masiva de los complejos, lo que pone de manifiesto su inestabilidad en fluidos biológicos. Por el contrario, las nanocápsulas de pADN/PArg y también las de pADN/PArg-PEG presentan un comportamiento mucho más favorable: las nanocápsulas de pADN/PArg-PEG permanecieron estables tras su dilución en tampón fosfato y las de pADN/PArg experimentaron un incremento inicial de su tamaño de 200 nm, pero en ningún caso fueron objeto de agregación masiva.

Asimismo, se evaluó la posible liberación prematura del ADN a partir de las nanocápsulas tras su incubación en tampón fosfato. Los resultados de gel de electroforesis mostrados en la Figura 4 muestran que tanto las nanocápsulas de PArg como las de PArg-PEG asocian eficazmente el pADN y no lo liberan tras su incubación en tampón fosfato.

### Ejemplo 3

#### *Evaluación de la capacidad de encapsulación del fármaco hidrofóbico docetaxel en nanocápsulas de PArg*

Se prepararon nanocápsulas de PArg en forma de clorhidrato, un núcleo oleoso compuesto por lecitina y Miglyol® 812. Se procedió a la incorporación de un fármaco hidrofóbico, tomando para ello el docetaxel, agente antitumoral prácticamente insoluble en agua. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 1.1., con una modificación, ya que una pequeña alícuota de una solución stock del ingrediente activo en etanol (1-100 mg/ml) es incorporada a la fase oleosa. Posteriormente dicha fase oleosa es añadida sobre una fase acuosa conteniendo la PArg formándose las nanocápsulas de PArg encapsulando docetaxel con relaciones de peso de docetaxel/nanocápsulas de PArg de hasta un 4%.

Una vez preparadas las nanocápsulas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando el fármaco libre mediante cromatografía líquida de alta resolución, con  $\lambda=227\text{nm}$ ), obteniéndose una eficacia de encapsulación del 74%. También se midieron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 7).

TABLA 7

	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
<b>NC PArg</b>	<b>145 ± 13</b>	<b>0,1</b>	<b>+53 ± 6</b>
<b>NC PArg DCX</b>	<b>170 ± 10</b>	<b>0,1</b>	<b>+56 ± 6</b>

## Ejemplo 4

*Liberación del fármaco docetaxel de las nanocápsulas de PArg*

5 Se realizaron nanocápsulas de PArg encapsulando el fármaco hidrofóbico docetaxel siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Las nanocápsulas fueron diluidas en tampón acetato (pH5, baja fuerza iónica) e incubadas en este medio en agitación horizontal (100 rpm) a 37°C. A diversos tiempos (1, 3, 6, 24 y 48 horas), se tomaron muestras de los medios de incubación y se aislaron las nanocápsulas en suspensión mediante ultrafiltración. Finalmente se valoró indirectamente la fracción de fármaco liberado cuantificando la cantidad de fármaco retenida en las nanocápsulas.

10

La cuantificación del docetaxel se realizó según lo descrito en el ejemplo 3. El perfil de cesión del fármaco de las nanocápsulas de PArg se recoge en la figura 5.

## Ejemplo 5

15

*Evaluación del tamaño de partícula de la formulación de nanocápsulas de PArg durante su almacenamiento*

Se prepararon nanocápsulas de PArg en forma de clorhidrato, un núcleo oleoso compuesto por lecitina y Miglyol® 812, según el procedimiento previamente descrito. Se realizaron medidas de tamaño de partícula durante nueve meses, con el fin de obtener información acerca de la evolución del sistema con el tiempo. Asimismo se evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento (4 y 37°C) sobre la estabilidad de las nanocápsulas. Los resultados presentados en las figuras 6 y 7 muestran la escasa variabilidad del tamaño de las nanocápsulas de PArg al 3 y 6% p/p respectivamente, durante el almacenamiento.

## Ejemplo 6

*Evaluación del efecto del crioprotector trealosa sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas de PArg tras el proceso de liofilización*

30 Se prepararon nanocápsulas de PArg en forma de clorhidrato, un núcleo oleoso compuesto por lecitina y Miglyol® 812, según el procedimiento previamente descrito. Se evaluó el efecto que tiene el agente crioprotector trealosa durante el proceso de liofilización de las nanocápsulas de PArg y en la posterior recuperación del tamaño de partícula tras la resuspensión ensayando dos concentraciones de trealosa, 5 y 10% p/v. Asimismo, se evaluaron la influencia de la concentración de nanocápsulas (0,25, 0,5 y 1% p/v) en la suspensión a liofilizar como el efecto de la concentración de PArg en el nanosistema (3 y 6% p/p). Los resultados de la figura 8 muestran el tamaño de partícula de las nanocápsulas de PArg liofilizadas tras la resuspensión. Se observa que las concentraciones elevadas de crioprotector preservan el tamaño de las nanocápsulas, así como la menor proporción de PArg en la muestra.

## Ejemplo 7

40

*Estudio de la capacidad de inhibición de la proliferación celular de las nanocápsulas de PArg*

Con el fin de evaluar el potencial de las nanocápsulas de PArg que encapsulan la molécula citostática docetaxel para inhibir la proliferación celular de la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460 se prepararon las nanocápsulas según el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Los resultados recogidos en la figura 9 muestran la mayor capacidad de inhibición de la proliferación de las nanocápsulas que encapsulan docetaxel en comparación con la molécula libre. Por otra parte la formulación de nanocápsulas de PArg sin cargar no mostró toxicidad alguna en el rango de concentraciones ensayado. Los valores de IC50, concentración a la cual se produce la inhibición de la proliferación del 50% de la población, fueron calculados mediante el programa Graph Pad Prism 2.1 (Graph Pad Software). De este modo, la solución de docetaxel presentó un valor de IC50 de 13,35 nM mientras que para la formulación de nanocápsulas de PArg encapsulando docetaxel fue de 3,28 nM, resultando la nanoencapsulación 4 veces más efectiva en la inhibición de la proliferación celular.

## Ejemplo 8

55

*Estudio de la captura celular de las nanocápsulas de PArg*

Con el fin de evaluar el potencial de la PArg como promotor de la entrada celular, se estudió la interacción de las nanocápsulas de PArg con la línea celular NCI-H460 en comparación con la nanoemulsión. Previamente se incorporó una molécula hidrofóbica fluorescente (fluoresceína-DHPE) en la formulación de nanocápsulas de PArg mediante la disolución del marcador en etanol y posterior incorporación en la fase oleosa. La figura 10 recoge los valores obtenidos de entrada celular de las nanocápsulas de PArg en comparación con la nanoemulsión y el marcador fluorescente libre. Los resultados muestran mayor captación celular de la formulación de nanocápsulas sugiriendo que la cubierta de PArg es clave para facilitar el proceso de entrada de los nanosistemas al interior de las células.

65

Ejemplo 9

*Estudio de la captura celular de las nanocápsulas de PArg dependiendo de la cantidad de PArg en el nanosistema*

5 Con el fin de evaluar si la mayor cantidad de PArg en las nanocápsulas favorece la interacción celular y posterior  
internalización, se estudió la captura celular de dos formulaciones de nanocápsulas de PArg con la línea celular NCI-  
H460. Las proporciones de PArg estudiadas fueron del 3 y 6% p/p. Previamente se incorporó una molécula hidrofóbica  
fluorescente (fluoresceín-DHPE) en la formulación de nanocápsulas de PArg mediante la disolución del marcador en  
10 etanol y posterior incorporación en la fase oleosa. La figura 11 recoge los valores obtenidos de entrada celular de  
las formulaciones de nanocápsulas de PArg al 3 y 6% p/p. Los resultados muestran que ambos sistemas tienen un  
comportamiento muy similar respecto a la captación celular.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas con un diámetro inferior a  $1\ \mu\text{m}$  que comprenden una sal de poliarginina, un fosfolípido negativo y un aceite.
2. Sistema según la reivindicación 1, que adicionalmente comprende uno o más ingredientes activos.
- 10 3. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende un ingrediente auxiliar hidrófobo; preferiblemente un derivado de polioxietileno; y más preferiblemente estearato de polietilenglicol.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sal de poliarginina se selecciona entre clorhidrato, bromhidrato, acetato y sulfato; preferentemente dicha sal es clorhidrato.
- 15 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fosfolípido negativo se selecciona entre lecitina, fosfatidil glicerol, fostatidil serina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y ácido fosfatídico; preferentemente dicho fosfolípido negativo es lecitina.
- 20 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el aceite se selecciona entre aceite de cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma; vitamina E, miristato de isopropilo, escualeno, Mygliol<sup>®</sup>, Labrafil<sup>®</sup>, Labrafac<sup>®</sup>, Peceol<sup>®</sup> y Maisine<sup>®</sup>; preferentemente dicho aceite es Mygliol<sup>®</sup>.
- 25 7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un ingrediente activo seleccionado entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos y nucleótidos o bien combinaciones de los mismos.
8. Sistema según la reivindicación 7, donde el ingrediente activo es docetaxel.
- 30 9. Sistema según la reivindicación 7, donde el ingrediente activo se selecciona entre un oligonucleótido, ARN de interferencia, un plásmido de ADN o un polinucleótido; preferentemente el ingrediente activo es un plásmido de ADN.
10. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se encuentra en forma liofilizada.
- 35 11. Procedimiento de obtención del sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:
- a) preparar una disolución acuosa de una sal de poliarginina;
- 40 b) preparar una disolución orgánica de un fosfolípido negativo y un aceite;
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las sistemas; y
- 45 d) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, que además comprende añadir un ingrediente activo.
- 50 13. Procedimiento de obtención del sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende recubrir una nanoemulsión, constituida al menos por un fosfolípido negativo, un aceite y una fase acuosa, mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa de una sal de poliarginina.
- 55 14. Procedimiento según la reivindicación 13, donde el proceso de incubación comprende mezclar la nanoemulsión con una disolución acuosa de poliarginina, preferentemente en una proporción 4:1.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, que además comprende añadir un ingrediente activo.
- 60 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que a continuación comprende una etapa de liofilización de los sistemas obtenidos en presencia de crioprotectores.
17. Procedimiento según la reivindicación anterior, que a continuación comprende una etapa para regenerar los sistemas liofilizados.
- 65 18. Composición farmacéutica que comprende el sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

## ES 2 347 119 A1

19. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, en donde dicha composición es para administración tópica, parenteral o a través de mucosas.

5 20. Composición cosmética que comprende el sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con uno ó más excipientes cosméticamente aceptables.

21. Uso de un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10 en la preparación de un medicamento.

10 22. Uso de un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la preparación de un medicamento para tratar cáncer.

15

20

25

30

35

40

45

50

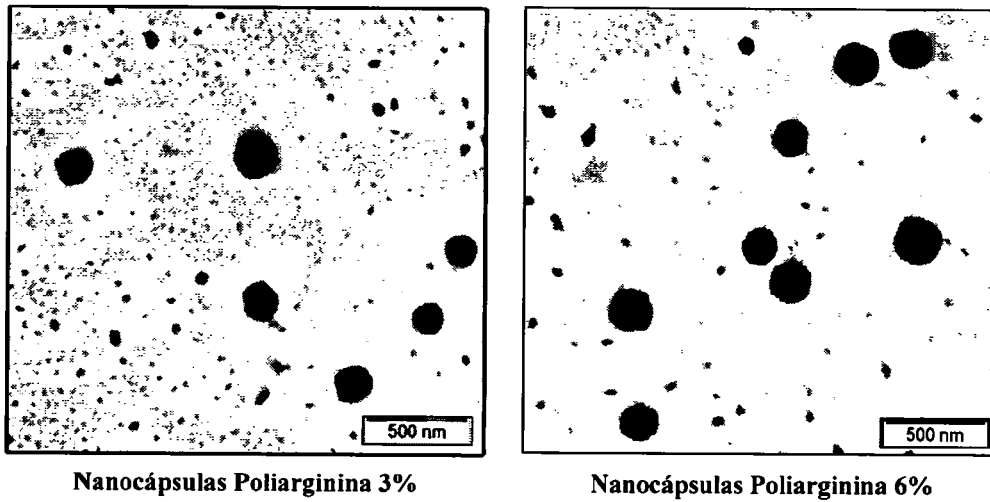
55

60

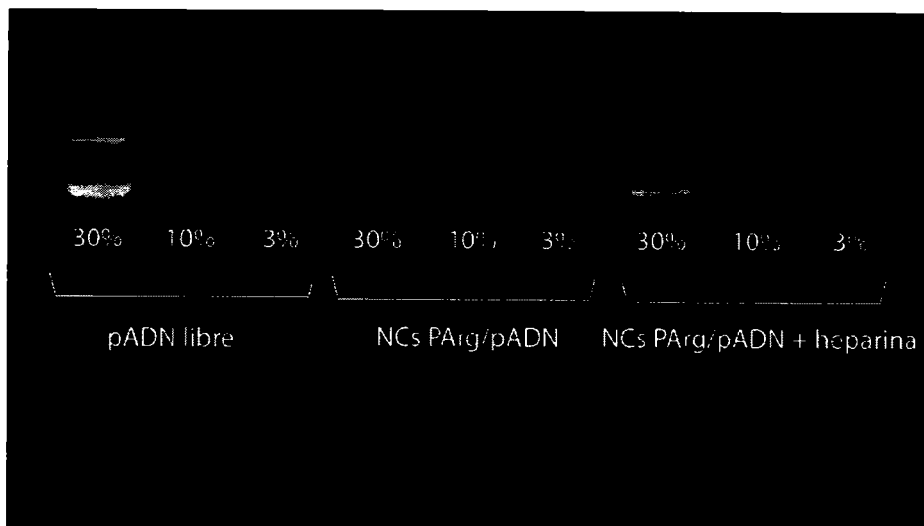
65



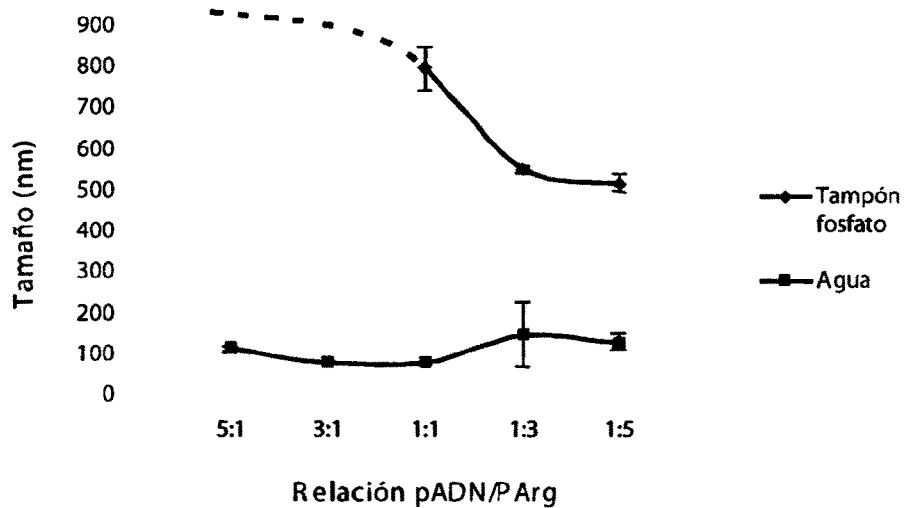
**FIGURA 1**



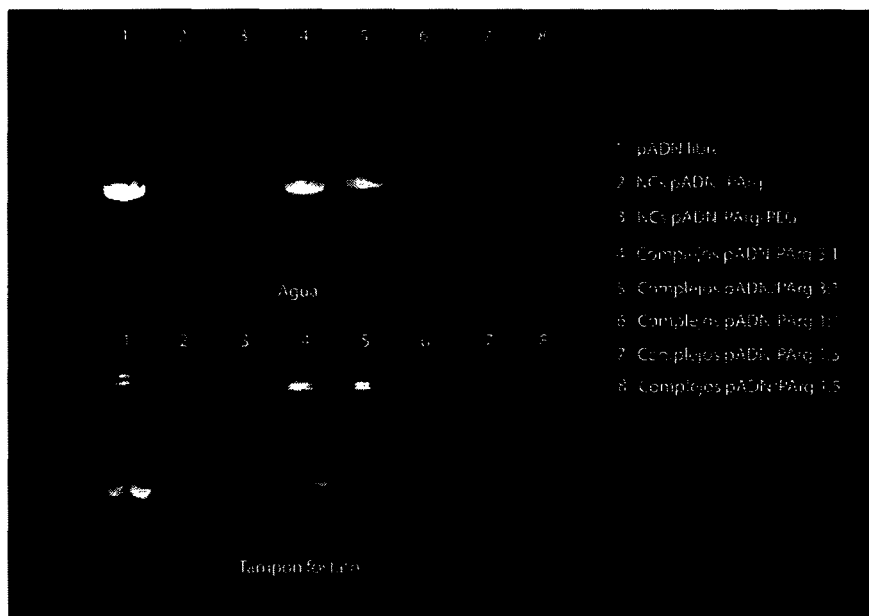
**FIGURA 2**



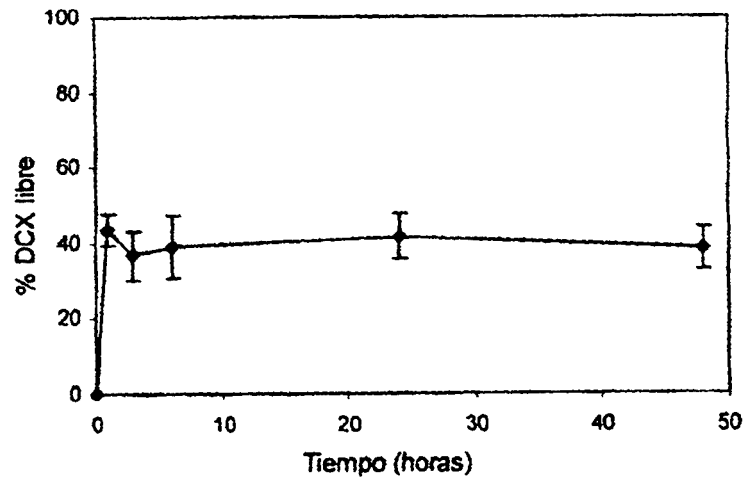
**FIGURA 3**



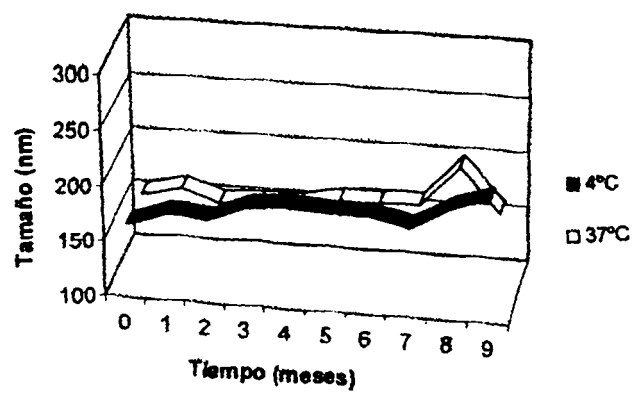
**FIGURA 4**



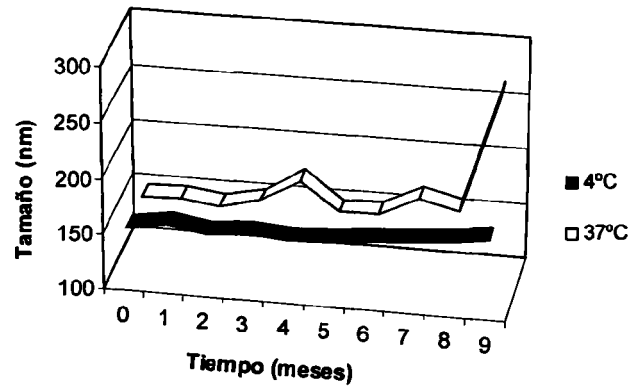
**FIGURA 5**



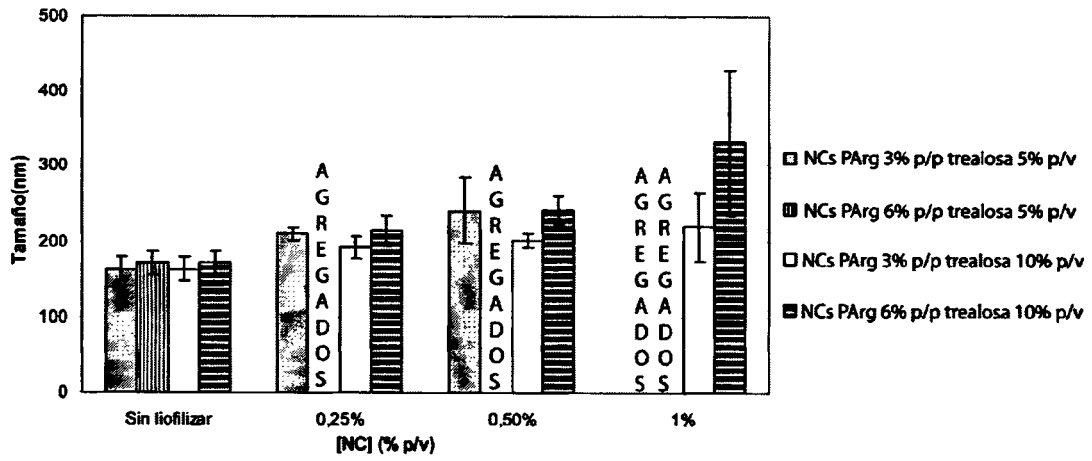
**FIGURA 6**



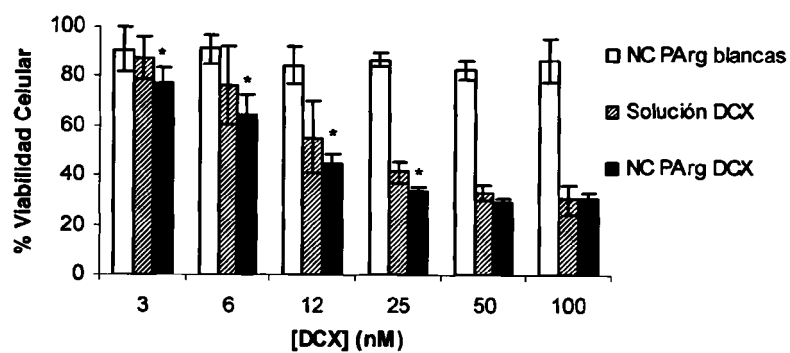
**FIGURA 7**



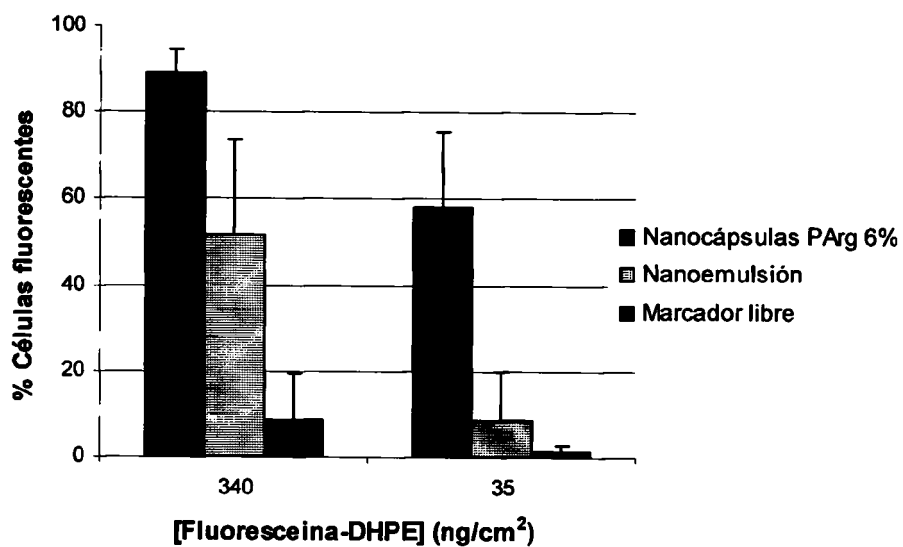
**FIGURA 8**



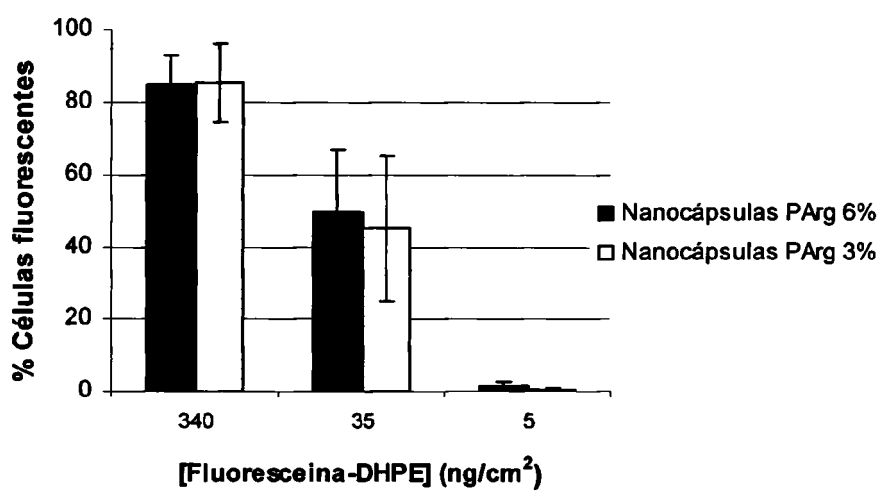
**FIGURA 9**



**FIGURA 10**



**FIGURA 11**





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 119

②1 N° de solicitud: 200901098

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 22.04.2009

③2 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5716614 A1 (KATZ et al.) 10.02.1998; columna 5, línea 11 - columna 10, línea 67; ejemplos 5 y 6.	1-22
A	LOZANO, M.V. et al.; Highly efficient system to deliver taxanes into tumor cells: docetaxel-loaded chitosan oligomer colloidal carriers; Biomacromolecules 2008, volumen 9, número 8, páginas 2186-2193; ISSN 1525-7797.	1-22
A	US 2006269606 A1 (GUSTAFSSON et al.) 30.11.2006; reivindicaciones.	1-22

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.07.2010

Examinador

N. Vera Gutiérrez

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

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

A61K, A61P

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

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



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.07.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-22	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-22	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5716614 A1	10-02-1998
D02	Biomacromolecules 2008, 9 (8), 2186-2193	2008

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

La invención se refiere a un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas con un diámetro inferior a 1 micrómetro, que comprenden una sal de poliarginina, un fosfolípido negativo y un aceite. Se refiere también a su procedimiento de preparación, a las composiciones farmacéutica y cosmética que comprenden dicho sistema y a su uso para la administración de medicamentos, en concreto un medicamento para tratar cáncer.

En el documento D01 se describe un método para la liberación de principios activos mediante la administración de un complejo que comprende el compuesto activo y un portador policatiónico lipofílico. Dicho portador incluye ácido eicosanoico y un policatión, como por ejemplo, poliarginina (reivindicación 1). Estos complejos se presentan en forma de micelas, vesículas o liposomas (columna 6, líneas 49-59).

En el documento D02 se evalúa el potencial de las nanocápsulas de oligómeros de quitosano como vehículo para el transporte del compuesto anticancerígeno docetaxel. Para ello, se preparan unas nanopartículas que comprenden un núcleo hidrofóbico formado por lecitina y el aceite Mygliol 812, y un recubrimiento de quitosano, obtenidas mediante interacciones iónicas entre el agente tensioactivo cargado negativamente (lecitina) y los oligómeros de quitosano cargados positivamente.

Ninguno de los documentos citados divulga un sistema para la administración de ingredientes activos que comprenda nanocápsulas a base de una sal de poliarginina, un fosfolípido negativo y un aceite. Además, no se considera obvio que un experto en la materia conciba un sistema de nanocápsulas con esas características a partir de lo divulgado en el estado de la técnica.

Por tanto, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1-22 de la solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.