

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 995**

21 Número de solicitud: 201130015

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.01.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
06.08.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA**
Edificio **CACTUS - Campus Sur**
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

72 Inventor/es:
ALONSO FERNÁNDEZ, M^a José;
TORRES LÓPEZ, Dolores;
RIVERA RODRÍGUEZ, Gustavo;
OYARZÚN AMPUERO, Felipe Andrés;
LOLLO, Giovanna;
GONZALO LÁZARO, Teresa y
GARCÍA FUENTES, Marcos

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **NANOCÁPSULAS CON CUBIERTA POLIMÉRICA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas que comprenden un aceite, un tensoactivo catiónico y un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico (PGA), ácido poliglutámico-polietilenglicol (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina (PAsn) o una combinación de los mismos, y opcionalmente un ingrediente activo, con la condición de que cuando dicho polímero incluye ácido poliglutámico o ácido poliglutámico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemnina o una tamandarina. La invención también se relaciona con procedimientos para la obtención de dicho sistema de nanocápsulas, sus composiciones farmacéuticas, así como el uso del mismo en medicina, particularmente en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

ES 2 385 995 A1

DESCRIPCIÓN

NANOCÁPSULAS CON CUBIERTA POLIMÉRICA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La incorporación de ingredientes activos en sistemas de tamaño nanométrico ha
10 ayudado a solventar 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. Así mismo, es también conocido que la capacidad de estos sistemas para atravesar las
15 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 μm , responden a este criterio.

20 Ácido poliglutámico (PGA)

El ácido poliglutámico (PGA) es un polímero hidrofílico y biodegradable constituido por unidades de ácido glutámico con carga negativa. Debido a propiedades biológicas como su no toxicidad, su no inmunogenicidad y su biocompatibilidad, este polímero ha llegado a ser considerado como un importante biomaterial para el
25 desarrollo de nuevas formulaciones para la liberación de fármacos (Buescher&Margaritis, Crit RevBiotech 2007).

Así por ejemplo, el empleo del ácido poliglutámico se encuentra ampliamente reportado para la formación de complejos fármaco-polímero de interés en el tratamiento de cáncer, encontrándose algunas formulaciones en avanzados estadios en su desarrollo.
30 Tal es el caso del Xyotax, una formulación que consta de conjugados entre el ácido poli-L-glutámico y el agente citostático paclitaxel, que actualmente se encuentra en fase

3 de experimentación clínica. También ha sido empleado este polímero en el diseño de formulaciones para la administración de otros agentes antitumorales como la doxorubicina (Shih et al., 2004).

Asimismo, se encuentra también reportado en el documento de patente US
5 2006246096, el uso del ácido poliglutámico para la formulación de sistemas de liberación de fármacos, siendo utilizado como cubierta en formulaciones para la vehiculización de material genético a partir de los mismos.

Otro tipo de sistema de liberación desarrollado a partir del ácido poliglutámico son las nanopartículas, tal como se describe en los documentos de patente US
10 2005238678 y US 6326511.

Por otro lado, el ácido poliglutámico ha sido también conjugado con polietilenglicol (PEG) con el objetivo de conseguir modificaciones en la superficie de sistemas nanométricos, tratando de brindar una mayor estabilidad a sistemas coloidales. Dicha modificación con PEG logra también minimizar el reconocimiento por parte de
15 las proteínas y células del sistema retículo endotelial hacia los nanosistemas, aumentando así el tiempo de circulación de los mismos.

El efecto de la conjugación del ácido poliglutámico con el PEG ha sido investigado en la solicitud de patente US 2003170201, donde se evalúa el potencial de los complejos constituidos a partir de este polímero para la liberación de fármacos
20 citostáticos.

Ácido hialurónico (HA)

El ácido hialurónico (HA) es un polímero de origen natural. Más concretamente es un glicosaminoglicano presente en la matriz extracelular de tejidos conectivos como
25 son el subcutáneo y el cartilaginoso; también se encuentra en el cuerpo vítreo del globo ocular y el fluido sinovial de las cavidades articulares. Se trata de un polímero capaz de interactuar con los receptores endógenos CD44 y RHAMM que se encuentran localizados a nivel de la superficie celular en prácticamente todas las células del organismo, a excepción de los glóbulos rojos. La interacción del ácido hialurónico con
30 estos receptores permite la regulación de determinados procesos fisiológicos como son la movilidad y proliferación celular. Debido a estas propiedades, el ácido hialurónico es utilizado en terapéutica, ya que ejerce un papel importante en procesos como

morfogénesis y desarrollo embrionario, cáncer e inflamación. Además, debido a las citadas propiedades, el ácido hialurónico es utilizado para promover la cicatrización de epitelios. Prueba de esta actividad biológica son numerosos trabajos en los que se incluye al ácido hialurónico como biomolécula activa, pudiendo mencionar los descritos por Sand et al. (Acta Ophthalmol. 67, 1989, 181-183), donde se aplica ácido hialurónico en el tratamiento de keratoconjuntivitis sicca, el de Nishida et al. (Exp. Eye Res. 53, 1991, 753-758), donde se aplica como cicatrizante a nivel corneal y el de Blanco et al. (Clin. Exp. Rheumatol. 22(3) 2004, 307-12), donde se aplica el polímero para el tratamiento de la artrosis, entre otros. Adicionalmente, el ácido hialurónico y sus derivados, bajo diferentes formas de presentación, han sido objeto de numerosos documentos de patente en los que se presenta como molécula activa. En este punto cabe destacar la solicitud de patente WO 96/06622, que reivindica la utilización del ácido hialurónico y derivados, sólo o en combinación con otro agente terapéutico, para modular la actividad celular de aquellos tejidos y células que en su superficie expresen receptores para el ácido hialurónico, y así tratar o prevenir procesos inflamatorios, fibrosis u oncogénesis. La patente US 6383478 protege un sistema de liberación consistente en micropartículas, nanopartículas o películas en los que se incorpora el ácido hialurónico como posible molécula activa para promover la angiogénesis.

Por otro lado, el ácido hialurónico también ha sido objeto de numerosos trabajos en los que se propone su utilización como biomaterial-excipientes empleado en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Su interés en esta línea se debe a que es un polímero biodegradable, biocompatible, no inmunogénico, mucoadhesivo y con afinidad selectiva por receptores como el CD44. En cuanto a los antecedentes enfocados a la obtención de formulaciones nanométricas utilizando el ácido hialurónico como biomaterial-excipientes se pueden citar, entre muchos otros, los siguientes:

- Solicitud de patente US 2007/0224277, que describe la preparación de nanopartículas de ácido hialurónico formadas por entrecruzamientos covalentemente.
- Solicitud de patente US 2003/0166602 A1, que divulga la elaboración de distintas formulaciones con un lípido modificado con ácido hialurónico y que puede albergar principios activos con actividad anticancerígena u otros agentes terapéuticos o diagnósticos.

- Solicitud de patente WO 2004/112758 A1, que describe la preparación en medio acuoso de nanopartículas conteniendo ácido hialurónico y que se forman por la interacción iónica entre éste, otros polímeros de carga complementaria y en presencia de un reticulante de tipo iónico.
- 5 - Luo and Prestwich (Bioconjugate Chem. 10, 1999, 755-763) sintetizan un conjugado entre el ácido hialurónico y el agente anticáncer Taxol y cuya actividad citotóxica es superior y más selectiva que la obtenida únicamente con Taxol en las líneas celulares de mama, colon y ovario que sobreexpresan el receptor CD44.
- 10 - Yenice et al (Experimental Eye Research 2008, 87(3), 162-7) y Barbault-foucher et al (Journal of Controlled Release 2002, 83, 365-375) describen nanoesferas de poli-ε-caprolactona recubiertas por ácido hialurónico como sistema de liberación ocular de fármacos.

15 **Poliasparagina (PAsn)**

La L-asparagina se encuentra descrita en la literatura como un aminoácido esencial para el crecimiento y el desarrollo de todo tipo de células, ya que interviene directamente en la síntesis de proteínas y de DNA y la fuente principal de este aminoácido se encuentra en la dieta.

20 La L-asparagina es actualmente una de las estrategias más y mejor utilizadas para el tratamiento del cáncer, encontrándose comercializada una formulación que incluye el enzima necesario para su degradación. Al administrar dicho enzima y conseguir su deposición en la periferia del tumor, se consigue una disminución de la concentración del aminoácido provocando deficiencias de éste, las células quedan
25 entonces impedidas de sintetizar DNA y otras proteínas esenciales para su supervivencia. Dicha formulación lleva por nombre Oncaspar[®] o Elspar[®], siendo el enzima responsable de esta degradación la L-asparaginasa.

Las células de cáncer en estadios de metástasis avanzados, especialmente en leucemia presentan una alta afinidad hacia la asparagina por un alto reconocimiento
30 superficial, esto debido a su rápida reproducción. Las células cancerosas no pueden suplir efectivamente sus necesidades básicas de este aminoácido, lo que en muchos casos deriva en la migración de dichas células en busca de concentraciones más altas de

este aminoácido hacia la periferia tumoral. Dicho reconocimiento y necesidad ha sido utilizado recientemente como una alternativa para el tratamiento de muchos cánceres en estadios de metástasis. Se han realizado numerosos estudios con sistemas nanométricos como lo son las micelas poliméricas o los liposomas recubiertos con derivados poliméricos fundamentados en asparagina.

Dichos estudios han demostrado un gran potencial para el desarrollo de nanosistemas basados en poliaminoácidos a base de asparagina como lo es la poliasparagina (PAsn) o la polihidroxielasparagina. Además, aunado a la especificidad otorgada por el reconocimiento en superficie de la asparagina, los polímeros a base de este aminoácido han demostrado tener propiedades hidrofílicas, estructurales y fisicoquímicas análogas a PEG, lo que otorga a dichos sistemas una mejora en la vida media del fármaco en curso, y una mejora notable en la farmacocinética y la biodistribución.

Dentro de los estudios relacionados con la poliasparagina, Storm y colaboradores (Metselaar, Bruin et al. 2003; Garcion, Lamprecht et al. 2006; Romberg, Kettenes-Van Den Bosch et al. 2006; Romberg, Metselaar et al. 2007; Romberg, Oussoren et al. 2007; Romberg, Oussoren et al. 2007; Romberg, Flesch et al. 2008; Romberg, Hennink et al. 2008) evaluaron la farmacocinética de dos diferentes tipos de recubrimiento sobre liposomas, variando el polímero de recubrimiento; comparando el PEG con la polihidroxielasparagina, los resultados favorecieron a la polihidroxielasparagina, presentando una mejor farmacocinética y un mayor tiempo de circulación a bajas dosis y con administración repetida.

Con la información presentada anteriormente se hace evidente el potencial y el interés que despiertan los compuestos anteriormente mencionados – el ácido poliglutámico y su copolímero con el PEG, el ácido hialurónico, y la poliasparagina – como biomaterial-excipiente en el desarrollo de nuevos sistemas de administración. Particularmente, sería conveniente disponer para determinadas aplicaciones de nanosistemas estables, que fueran aptos para encapsular y proteger moléculas de distintas características y que además presentaran buenas propiedades de adsorción e internalización en las superficies biológicas deseadas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema nanocapsular de fácil obtención mediante distintos procedimientos experimentales, en donde las
5 nanocápsulas comprenden un polímero, un aceite y un tensoactivo catiónico. Dichos sistemas de nanocápsulas permiten una asociación eficaz de ingredientes activos lipofílicos así como hidrofílicos. El tamaño reducido de dichas nanocápsulas (diámetro inferior a 1 μm) posibilita su paso a través de barreras biológicas y que sean internalizadas por las células. Asimismo, la presencia de una cubierta polimérica,
10 además de conferir mayor estabilidad a las nanocápsulas, proporciona distintas características beneficiosas en función de cada tipo de cubierta en particular.

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas que comprenden un aceite, un tensoactivo catiónico, un polímero seleccionado del grupo que consiste en
15 ácido poliglutámico (PGA), ácido poliglutamico-poli(etilenglicol) (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina (PAsn) o una combinación de los mismos, y opcionalmente un ingrediente activo,

con la condición de que cuando dicho sistema de nanocápsulas incluye ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-poli(etilenglicol) (PGA-PEG), entonces el
20 ingrediente activo no es una didemina o una tamandarina.

Adicionalmente, las nanocápsulas de la invención también pueden comprender de manera opcional otros componentes como por ejemplo un tensoactivo soluble en agua, un tensoactivo soluble en aceite o ambos.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que
25 comprende el sistema definido anteriormente.

Asimismo, la invención se refiere al uso de dicho sistema 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
30 obtención del sistema definido anteriormente (denominado en los ejemplos procedimiento de difusión de disolvente en una etapa), que comprende:

- 5
- a) preparar una disolución acuosa que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico (PGA), ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina (PAsn) o una combinación de los mismos, y opcionalmente un tensoactivo soluble en agua;
 - b) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite y un tensoactivo catiónico, y opcionalmente un tensoactivo adicional soluble en aceite;
 - c) mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas; y
- 10
- d) 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 lipofílico (hidrofóbico) o anfifílico se lleva a cabo por adición de éste a la etapa b). Los ingredientes activos de naturaleza hidrofílica pueden ser añadidos en la etapa a) del procedimiento o en una etapa posterior a la etapa d) mediante un proceso de incubación.

15

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 aceite, un tensoactivo catiónico, opcionalmente un tensoactivo soluble en aceite, y una fase acuosa que opcionalmente comprende un tensoactivo soluble en agua, con un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico (PGA), ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina (PAsn) o una combinación de los mismos.

20

Según una realización particular, el procedimiento anterior además comprende añadir un ingrediente activo. Tal como se ha definido anteriormente, cuando el polímero es ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemnina o una tamandarina.

25

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

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Evolución del tamaño de partícula y polidispersión de nanocápsulas de poliglutámico (**1.a**) y poliglutámico-polietilenglicol (**1.b**) a 37°C durante un período de 48 h.

5 **Figura 2:** Tamaño de partícula de nanocápsulas de poliglutámico-polietilenglicol (**2.a**) y poliglutámico (**2.b**), tras ser liofilizadas a distintas concentraciones (0.025-1% p/v) con el crioprotector trehalosa (5 y 10% p/v).

Figura 3: Imágenes de TEM de nanocápsulas de ácido hialurónico preparadas con el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio.

10 **Figura 4:** Perfil de liberación de docetaxel (DCX) obtenido a partir de nanocápsulas de ácido hialurónico preparadas con los tensoactivos catiónicos cloruro de benzalconio (BKC) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB).

Figura 5: Evolución del tamaño de partícula de nanocápsulas de ácido hialurónico preparadas con el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (**5.a**) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (**5.b**) en su almacenamiento a 4°C y 37°C, durante un período de 3 meses.

Figura 6: Tamaño de partícula de nanocápsulas de ácido hialurónico preparadas con el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio, tras ser liofilizadas a distintas concentraciones (0.25-1% p/v) con el crioprotector trehalosa (5 y 10% p/v).

20 **Figura 7:** Viabilidad de la línea celular de cáncer NCI-H460 tras 2 (**7.a**) y 48 (**7.b**) horas de contacto con nanocápsulas de ácido hialurónico (NCs HA) blancas, docetaxel (DCX) en solución, y con nanocápsulas de ácido hialurónico conteniendo docetaxel, para distintas concentraciones del antitumoral. El tensoactivo catiónico utilizado en la preparación de las nanocápsulas fue el bromuro de
25 hexadeciltrimetilamonio.

Figura 8: Imágenes de TEM de nanocápsulas de poliasparagina elaboradas con el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (**8.a**) o con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (**8.b**).

Figura 9: Perfil de liberación de docetaxel (DCX) obtenido a partir de
30 nanocápsulas de poliasparagina preparadas con el tensoactivo catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

Figura 10: Evolución del tamaño de partícula y potencial zeta de nanocápsulas de poliasparagina preparadas con el tensoactivo catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio durante su almacenamiento a 4°C (**10.a**) y 37°C (**10.b**) y de los mismos sistemas preparados con el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio durante su almacenamiento a 4°C (**10.c**) y 37°C (**10.d**).

Figura 11: Viabilidad de la línea celular de cáncer NCI-H460 tras 2 (**11.a**) y 48 (**11.b**) horas de contacto con nanocápsulas de poliasparagina (NCs PAsn) blancas, docetaxel (DCX) en solución, y con nanocápsulas de poliasparagina conteniendo docetaxel, para distintas concentraciones del antitumoral. El tensoactivo catiónico utilizado en preparación de las nanocápsulas fue el bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se dirige al diseño y desarrollo de nanocápsulas para la administración de ingredientes activos, en donde las nanocápsulas del sistema tienen un diámetro inferior a 1 μm y se caracterizan por comprender (a) una cubierta de un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico, ácido poliglutámico-polietilenglicol, ácido hialurónico, poliasparagina o una combinación de los mismos y (b) un núcleo que comprende a su vez un aceite y un tensoactivo catiónico. Las nanocápsulas de la invención también comprenden preferiblemente al menos un ingrediente activo, con la condición de que cuando el polímero es ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemina o una tamandarina.

25 *Nanocápsulas: naturaleza y tamaño*

La ventaja de los sistemas de nanocápsulas con respecto a los sistemas de emulsiones es la presencia de un polímero recubriendo los núcleos oleosos que les puede conferir una mayor estabilidad y protección frente a la agregación, un cambio en el perfil de liberación del fármaco asociado, una mayor internalización celular y una interacción específica con determinados tipos celulares.

En comparación con otros sistemas como los liposomas o las nanopartículas, que generalmente se ven condicionadas a una limitada carga de fármaco, las nanocápsulas

poseen una mayor posibilidad de carga, en particular de fármacos lipofílicos, debido a la presencia del núcleo oleoso. Otra de las grandes ventajas de las nanocápsulas es la capacidad de combinar fármacos de diferente naturaleza, pudiendo estar un fármaco lipofílico encapsulado en el núcleo y un fármaco hidrofílico asociado a la cubierta; 5 asimismo, la cubierta les brinda estabilidad, protección y especificidad.

Estos sistemas presentan además ventajas respecto a otros 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 10 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 la nanomedicina y los nanosistemas de liberación de fármacos ha permitido fijar una 15 frontera claramente definida entre los sistemas nanométricos (que poseen un tamaño inferior a una micra ej. nanopartículas y nanocápsulas) y los sistemas micrométricos (micropartículas y microcápsulas). Además de las diferencias de comportamiento en cuanto a su capacidad para ser internalizados por las células y superar complejas barreras biológicas, en el caso de las formulaciones destinadas a la administración 20 intravenosa de fármacos antitumorales es imprescindible el tamaño nanométrico de los sistemas de liberación a fin de prevenir la obstrucción de los capilares sanguíneos. Asimismo, se sabe que las posibilidades de los nanosistemas para alcanzar el tejido tumoral están estrictamente relacionadas con su tamaño y también por el carácter hidrofílico de su superficie.

Las nanocápsulas de los sistemas de la presente invención presentan un diámetro 25 medio inferior a 1 μm , respondiendo por tanto a la definición de nanosistema, sistema coloidal constituido a base de polímeros con un tamaño inferior a 1 μm , es decir, tienen un tamaño de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 30 y 500 nm. El tamaño de las nanocápsulas está influido principalmente por la composición y las condiciones de 30 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 compuesto

de cubierta en la formulación, obteniéndose en todos los casos sistemas de tamaño nanométrico.

Asimismo, es importante destacar la diferencia entre los sistemas de nanocápsulas y los “complejos”. Se entiende por “complejos” la nanoestructura formada por la interacción de polielectrolitos o bien por polielectrolitos y tensoactivos de carga opuesta. Los sistemas de nanocápsulas de la presente invención se diferencian de los complejos de poliglutámico-paclitaxel (US 2003170201) o de ácido hialurónico (Kim et al. J. Gene Med. (2009) 11:791) por tratarse de un sistema transportador nanocapsular, tipo reservorio, en cuyo núcleo se pueden alojar un importante número de moléculas que tengan una mayor o menor afinidad por los lípidos (encapsulación) y en cuya cubierta pueden incorporarse moléculas hidrofílicas que tengan una cierta afinidad por la misma (adsorción). Estas características permiten mantener la integridad y funcionalidad de la nanoestructura, así como aportar mayor estabilidad en presencia de fluidos biológicos.

15

Componentes

Ácido poliglutámico (PGA) y ácido poliglutámico-polietilenglicol (PGA-PEG)

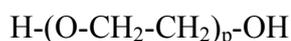
Tal como se ha mencionado en los antecedentes, el ácido poliglutámico y su conjugado con PEG constituyen biomateriales muy interesantes en el diseño de sistemas de liberación de moléculas activas.

Como se utiliza aquí, PGA incluye las sales solubles en agua de PGA, como la sal de amonio y sales metálicas de PGA, como la sal de litio, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, etc. Además, en una realización, la forma de PGA se selecciona a partir del ácido poli-D-glutámico, ácido poli-L-glutámico, ácido poli-D,L-glutámico, ácido poli- α -glutámico, ácido poli- α -D-glutámico, ácido poli- α -L-glutámico, ácido poli- α -D,L-glutámico, ácido poli- γ -glutámico, ácido poli- γ -D-glutámico, ácido poli- γ -L-glutámico, y ácido poli- γ -D,L-glutámico, y sus mezclas. En otra realización, la forma preferida de PGA es el ácido poli-L-glutámico, y aún más preferido es la sal sódica del ácido poli-L-glutámico. En otra realización, la forma preferida de PGA es el ácido poli- α -glutámico, y aún más preferido es la sal sódica del ácido poli- α -glutámico.

Además, las nanocápsulas de la invención se pueden formar a partir de derivados hidrosolubles de PGA o PGA-PEG, en donde PGA está sustituido en una o más posiciones disponibles, por ejemplo los grupos amina y/o ácido carboxílico, con uno o más grupos adecuados. Derivados adecuados de PGA y PGA-PEG incluyen derivados de poli(alquilglutamina) y derivados de PEG-poli(alquilglutamina), tales como poli(N-2-(2'-hidroxietoxi)etil-L-glutamina) (PEEG), PEG-PEEG, poli(N-3-(hidroxipropil)-L-glutamina) (PHPG), PEG-PHPG, poli(N-2-(hidroxietil)-L-glutamina) (PHEG), PEG-PHEG, poli(γ -bencil-L-glutamato) (pBG), PEG-pBG, poli(γ -tricloroetil-L-glutamato) (pTCEG), PEG-pTCEG, poli(dimetilaminoetil-L-glutamina) (pDMAEG), PEG-pDMAEG, poli(piridinoetil-L-glutamina) (pPyAEG), PEG-pPyAEG, poli(aminoetil-L-glutamina) (pAEG), PEG-pAEG, poli(histamino-L-glutamina) (pHisG), PEG-pHisG, poli(agmatino-L-glutamina) (pAgmG), y PEG-pAgmG, y sus mezclas (Hoste et al. *J. Control. Release*, 2000, 64, 53-61; Dekie J. *Control. Release*, 2000, 65, 187-202; Dubruel et al. *Biomacromolecules*, 2003, 4, 1168-1176). En cualquier caso, cualquier persona experta en la materia es capaz de identificar las modificaciones que se pueden llevar a cabo en PGA para dar lugar a derivados hidrosolubles del mismo.

La presencia de una cubierta a base de un polímero pegilado otorga a las nanocápsulas una mayor estabilidad en plasma y un incremento en el tiempo de residencia en el organismo facilitando la llegada a la diana terapéutica. Así, la modificación de superficie de las nanoestructuras con cadenas de PEG consigue reducir su captura por parte del sistema fagocítico mononuclear a través de lo que se ha denominado el sistema escudo (“stealth system”) o de largo tiempo de circulación (“long circulation systems”) (Park J. H. et al, 2008). Gracias a su presencia prolongada en el torrente circulatorio, se observó que estos sistemas disponían de una mayor posibilidad de acceso a los órganos diana. Esta modificación resulto de interés para el transporte y orientación de fármacos citostáticos, cuyo tejido diana presenta habitualmente una hipervascularización y una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos.

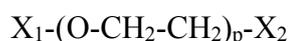
El polietilenglicol (PEG), en su forma más común, es un polímero de fórmula (I):



(I)

donde p es un número entero que representa el grado de polimerización del PEG.

Para la formación del conjugado ácido poliglutámico-polietilenglicol ha de emplearse un PEG modificado en el cual uno o los dos grupos hidroxilo terminales se encuentran modificados. Entre los PEG modificados que pueden emplearse para la obtención de los conjugados PGA-PEG se encuentran aquellos que presentan la fórmula (II):



(II)

10 donde:

X_1 es hidrógeno o un grupo protector de radicales hidroxilo que bloquea la función OH para reacciones posteriores. Los grupos protectores de radicales hidroxilo son ampliamente conocidos en la técnica; grupos protectores representativos (incluyendo ya el oxígeno a proteger) son por ejemplo los éteres de sililo como el trimetilsilil éter, trietilsilil éter, terc-butildimetilsilil éter, terc-butildifenilsilil éter, triisopropilsilil éter, dietilsopropilsilil éter, tetradimetilsilil éter, trifenilsilil éter, di-terc-butilmethylsilil éter; éteres de alquilo, como metil éter, terc-butil éter, bencil éter, de p-metoxibencil éter, 3,4-dimetoxibencil éter, tritil éter, alil éter; éteres de alcoximetilo como metoximetil éter, 2-metoxietoximetil, benciloximetil éter, p-metoxibenciloximetil éter, 2-(trimetilsilil)etoximetil éter; éteres de tetrahidropiranilo y éteres relacionados; metiltiometil éter; ésteres como éster de acetato, éster de benzoato, éster de pivalato, éster de metoxiacetato, éster de cloroacetato, éster de levulinato; carbonatos como carbonato de bencilo, carbonato de p-nitrobencilo, carbonato de terc-butilo, carbonato de 2,2,2-tricloroetilo, carbonato de 2-(trimetilsilil)etilo, carbonato de alilo. Otros ejemplos de grupos protectores de hidroxilo se puede encontrar en libros de referencia como "Protective Groups in Organic Synthesis" de Greene y Wuts, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999. En una realización preferida, el grupo protector es un alquil éter, preferiblemente que es el éter de metilo.

X_2 es un grupo puente que permita el anclaje a los grupos del ácido poliglutámico y a los grupos de los derivados del mismo. De forma alternativa X_1 puede ser igualmente un grupo que permita el anclaje con otros PGA y derivados del mismo.

Preferiblemente, los PEGs están unidos a PGA y sus derivados a través de los grupos amina y/o ácido carboxílico de este último. La pegilación de los polímeros se puede realizar utilizando cualquier método adecuado disponible en la técnica (como los descritos en Veronese et al. DDT, 2005, 10(21), 1451-1458; Nishiyama et al. Cancer Research 2003, 63, 8977-8983; Cabrera et al. J. Control. Release, 2005, 101, 223-232; US 2003/0170201).

Estos polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular adecuado para un uso dado es determinado fácilmente por un experto en la materia. Así, por ejemplo, un peso molecular adecuado de PGA en polímeros PGA y PGA-PEG puede ser de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 80 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 50 kDa, y aún más preferiblemente aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, y aproximadamente 35 kDa.

Un peso molecular adecuado para PEG en polímeros PGA-PEG y en derivados hidrosolubles de los mismos puede ser entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 50 kDa, preferiblemente entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 40 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 3 kDa y aproximadamente 30 kDa, y aún más preferiblemente aproximadamente 4 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 6 kDa, aproximadamente 7 kDa, aproximadamente 8 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 21 kDa, aproximadamente 22 kDa, aproximadamente 23 kDa, aproximadamente 24 kDa, aproximadamente 25 kDa, y aproximadamente 30 kDa.

Además, los polímeros PGA-PEG y los derivados solubles en agua del mismo están disponibles en una variedad de grados de pegilación y el grado de pegilación apropiado para un uso dado es determinado fácilmente por un experto en la materia. Este grado de pegilación se define como el porcentaje de grupos funcionales de PGA o de grupos funcionales de los derivados de PGA que están funcionalizados con PEG. Por lo tanto, los grados adecuados de pegilación en polímeros PGA-PEG y en derivados hidrosolubles de los mismos pueden estar entre aproximadamente 0,1% y

aproximadamente 10%, preferiblemente entre aproximadamente 0,2% y aproximadamente 5%, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 2%, y aún más preferiblemente aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,6%, aproximadamente 0,7%, aproximadamente 0,8%,
 5 aproximadamente 0,9%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,1%, aproximadamente 1,2%, aproximadamente 1,3%, aproximadamente 1,4%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 1,6%, aproximadamente 1,7%, aproximadamente 1,8%, aproximadamente 1,9%, y aproximadamente 2%.

Por otra parte, la proporción de PEG en los polímeros PGA-PEG y derivados
 10 hidrosolubles de los mismos puede ser entre aproximadamente 10% y 90% (p/p) con respecto al peso total del polímero, preferiblemente entre aproximadamente 15% y 80%, más preferiblemente entre aproximadamente 20% y 70%, y aún más preferiblemente aproximadamente 20%, aproximadamente 22%, aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 30%,
 15 aproximadamente 32%, aproximadamente 34%, aproximadamente 36%, aproximadamente 38%, aproximadamente 40%, aproximadamente 42%, aproximadamente 44%, aproximadamente 46%, aproximadamente 48%, aproximadamente 50%, aproximadamente 52%, aproximadamente 54%, aproximadamente 56%, aproximadamente 58%, y aproximadamente 60%.

20

Ácido hialurónico (HA)

La presencia del ácido hialurónico en la superficie de las nanocápsulas les otorga la capacidad de adherirse a superficies mucosas debido a su conocida propiedad mucoadhesiva. Por otro lado, presentan un gran potencial para lograr una vehiculización
 25 activa hacia las células que presenten un rápido crecimiento y sobreexpresión del receptor CD44 lo que les permite formar tejidos; un claro ejemplo de este comportamiento celular se ve evidenciado en varios tipos de células cancerosas.

Como se utiliza aquí, HA incluye las sales solubles en agua de HA así como derivados hidrosolubles de HA. En una realización particular, la sal de ácido
 30 hialurónico se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, de potasio, de magnesio, de calcio y de zinc. De forma preferida la sal de ácido hialurónico es sódica.

Poliasparagina (PAsn)

La presencia del poliaminoácido neutro poliasparagina en la superficie brinda a la nanocápsula de estabilidad, de una larga vida en el organismo, protección frente al sistema fagocítico mononuclear y especificidad en su interacción con determinadas
5 células diana.

La presencia de poliasparagina en la superficie de las nanocápsulas además brinda una mayor especificidad hacia las células cancerosas por parte de los sistemas, debido a que dichas células presentan una mayor necesidad de asparagina para mantener su desarrollo. Las células cancerosas son incapaces de auto-satisfacer sus necesidades
10 por este aminoácido, contrariamente a lo que sucede con células normales.

Como se utiliza aquí, PAsn incluye las sales solubles en agua de PAsn así como derivados hidrosolubles de PAsn.

Las nanocápsulas comprenden un aceite y un tensoactivo catiónico en el núcleo.
15 El aceite puede ser volátil o no volátil y en una realización particular, se selecciona entre aceites naturales, semisintéticos y sintéticos de uso farmacéutico o una combinación de los mismos, tales como aceites de origen animal, vegetal, aceites hidrocarbonados o aceites de silicona. Aceites adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, aceite de escualeno, aceites de sabor, aceite de silicona, aceites
20 esenciales, vitaminas insolubles en agua, isopropil estearato, butil estearato, octil palmitato, cetil palmitato, tridecil behenato, diisopropil adipato, dioctil sebacato, mentil antranilato, cetil octanoato, octil salicilato, isopropil miristato, cetoles de dicarpato de neopentilglicol, Cerafilos®, decil oleato, C₁₂-C₁₅ alquil lactatos, cetil lactato, lauril lactato, isostearyl neopentanoato, miristil lactato, isocetil estearoil estearato, octildodecil
25 estearoil estearato, aceites de hidrocarburos, isoparafina, parafinas fluidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de colza, aceite de chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de lino, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palma fraccionado, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de semilla de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de
30 calabaza, aceite de salvado de arroz, cártamo, aceite de té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de macadamia, aceite de germen de trigo, aceite de almendra, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de

girasol, aceite de cáñamo, aceite de bois, aceite de nuez de Kukui, aceite de aguacate,
 aceite de nuez, aceite de pescado, aceite de baya, aceite de pimienta de Jamaica, aceite
 de enebro, aceite de semilla, aceite de semilla de almendra, aceite de semilla de anís,
 aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez
 5 moscada, aceite de hoja de albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela,
 aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón,
 aceite de hoja de melaleuca, aceite de orégano, aceite de hoja de pachuli, aceite de hoja
 de menta, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de menta verde,
 aceite de hoja del árbol de té, aceite de hoja de tomillo, aceite de hoja de té de Canadá,
 10 aceite de flor, aceite de camomila, aceite de salvia romana, aceite de clavo, aceite de
 flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de flor de jazmín, aceite de flor de
 lavanda, aceite de flor de mauka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja,
 aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza
 de casia, aceite de corteza de canela, aceite de corteza de safrán, aceite de madera,
 15 aceite de madera de alcanfor, aceite de madera de cedro, aceite de palo de rosa, aceite
 de sándalo, aceite de madera de jengibre, aceite de resina, aceite de recino, aceite de
 mirra, aceite de piel, aceite de piel de Bérnago, aceite de piel de pomelo, aceite de piel
 de limón, aceite de piel de lima, aceite de piel de naranja, aceite de piel de mandarina,
 aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido linoleico, oleil alcohol, alcohol de
 20 isostearilo, oleato de etilo, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol® y Maisine®,
 derivados sintéticos o semisintéticos de los mimos y combinaciones de los mismos.

En una realización más particular, el aceite se selecciona entre aceite de
 cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma; vitamina E, miristato de
 isopropilo, escualeno, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol® y Maisine® o mezclas
 25 de los mismos. De forma preferida el aceite es Miglyol®.

En la presente invención, el término “tensoactivo catiónico” alude a un
 componente que posee estructuras y/o grupos funcionales que les permiten interactuar
 simultáneamente con la parte lipófila e hidrófila de la formulación siendo ésta última
 interacción favorecida por la presencia de un grupo funcional catiónico. En una
 30 realización particular, el tensoactivo catiónico se selecciona entre aminas primarias,
 secundarias y terciarias altamente cationizables y aminas cuaternarias. En una
 realización más particular, el tensoactivo catiónico se selecciona entre oleilamina,

estearilamina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltiridinio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de trimetiltetradecilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio y poloxaminas (p.ej. Tetronic®) o mezclas de los mismos. De forma preferida el tensoactivo catiónico es
5 cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

Asimismo, las nanocápsulas según la presente invención opcionalmente pueden contener un tensoactivo soluble en aceite, un tensoactivo soluble en agua o ambos, que favorecen estéricamente la estabilidad del sistema y que permiten modular la carga
10 eléctrica superficial de las nanocápsulas y aportar estabilidad al sistema.

En la presente invención, los términos “tensoactivo soluble en aceite” o “tensoactivo soluble en agua” aluden a componentes que poseen estructuras y/o grupos funcionales que les permiten interaccionar simultáneamente con la parte lipófila e hidrófila de la formulación siendo ésta última interacción favorecida con respecto a la
15 parte lipófila en el caso de los tensoactivos solubles en aceite o con respecto a la parte hidrófila en el caso de los tensoactivos solubles en agua.

En relación con estos tensoactivos opcionales, dependiendo de sus propiedades de solubilidad agua/aceite, entre los tensoactivos adecuados en la presente invención se incluyen fosfolípidos como lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol,
20 difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina; colesterol; gliceril monoestearato; copolímeros polioxietileno polipropileno (poloxámeros); polietilen glicol; polipropilén glicol; alcohol cetílico; alcohol cetoestearílico; alcohol estearílico; alcoholes de poliéter de arilo alquilo; ésteres de ácidos grasos de sorbitán (como Span® y Arlacel®); ésteres de ácidos grasos de polioxietileno (como Myrj®);
25 ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (polisorbatos); éteres de polioxietilenalquilo (éteres macrogol); éteres de alcoholes grasos (como Brij®), y mezclas de los mismos.

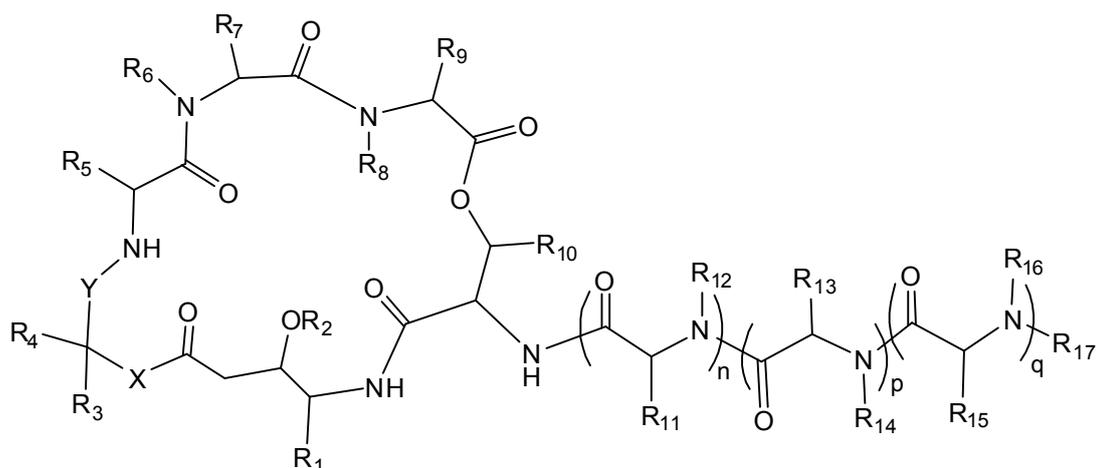
Según una realización preferida, el tensoactivo soluble en aceite es un fosfolípido seleccionado entre lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina,
30 fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, preferiblemente lecitina.

Según otra realización preferida, el tensoactivo soluble en agua es un derivado hidrofílico del polieoxietileno, preferiblemente poloxámero, o un polisorbato. En la presente invención el término “poloxámero” alude a un copolímero tribloque no iónico compuesto por una cadena hidrofóbica central de polioxipropileno unida a dos cadenas
5 hidrofílicas de polioxietileno. De forma preferida el poloxámero es el 188.

Tal como se ha definido anteriormente, las nanocápsulas de la invención también comprenden de manera opcional al menos un ingrediente activo. El término “ingrediente activo” se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en el tratamiento,
10 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, etc. Los sistemas de nanocápsulas objeto de la presente invención son adecuados para incorporar ingredientes activos de naturaleza lipófila o hidrófila. En una realización preferida, el ingrediente activo es docetaxel.

15 La proporción de ingrediente activo incorporado dependerá en cada caso del ingrediente activo que va a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración.

Nanocápsulas que comprenden un aceite, un tensoactivo catiónico, un polímero seleccionado entre PGA y PGA-PEG y un ingrediente activo seleccionado entre una didemnina o una tamandarina quedan fuera de la presente solicitud de patente y son
20 objeto de la solicitud de patente europea EP11382003.9 con el título “Nanocapsules for use in pharmaceutical compositions”, depositada el mismo día que la presente solicitud. Las didemninas y tamandarinas son ciclodepsipéptidos que exhiben una amplia variedad de actividades biológicas, tales como antitumoral, inmunosupresora y
25 antiviral. Ejemplos de este tipo de compuestos (excluidos de la presente invención para nanocápsulas de PGA o PGA-PEG) caen dentro de la siguiente fórmula general:



en la que X se selecciona entre O y NH;

Y se selecciona entre CO y $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$;

5 n y p se seleccionan independientemente entre 0 y 1, y q se selecciona entre 0, 1 y 2;

R₁, R₃, R₅, R₉, R₁₁, y R₁₅ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido, C₂-C₆ alquenilo sustituido o no sustituido, y C₂-C₆ alquinilo sustituido o no sustituido;

R₂ se selecciona entre hidrógeno, COR_a, COOR_a, C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido, C₂-C₆ alquenilo sustituido o no sustituido, y C₂-C₆ alquinilo sustituido o no sustituido;

R₄, R₈, R₁₀, R₁₂, y R₁₆ se seleccionan independientemente entre hidrógeno y C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido;

R₇ y R₁₃ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido, C₂-C₆ alquenilo sustituido o no sustituido, y C₂-C₆ alquinilo sustituido o no sustituido; R₆ y R₁₄ se seleccionan independientemente entre hidrógeno y C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido; o R₆ y R₇ y/o R₁₃ y R₁₄, junto con su correspondiente átomo de N y de C a los cuales están unidos, pueden formar un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido;

20 R₁₇ se selecciona entre hidrógeno, COR_a, COOR_a, CONHR_b, COSR_c, (C=NR_b)OR_a, (C=NR_b)NHR_b, (C=NR_b)SR_c, (C=S)OR_a, (C=S)NHR_b, (C=S)SR_c, SO₂R_c, SO₃R_c, C₁-C₁₂ alquilo sustituido o no sustituido, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido o no sustituido, y C₂-

C₁₂ alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y grupo heterocíclico sustituido o no sustituido; y

R_a, R_b, y R_c se seleccionan independientemente entre hidrógeno, C₁-C₁₂ alquilo sustituido o no sustituido, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido o no sustituido, y C₂-C₁₂ alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y grupo heterocíclico sustituido o no sustituido;

o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o esteroisómero de los mismos.

En particular, de acuerdo a la presente invención si las nanocápsulas comprenden ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es aplidina.

Procedimiento de obtención

Los procedimientos de obtención de los sistemas de nanocápsulas son métodos sencillos que evitan 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 anteriormente la obtención del sistema implica interacciones no covalentes. 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 que comprenden un aceite y un tensoactivo catiónico, en cuya superficie se une el polímero de recubrimiento a través de diferentes tipos de interacción. Se trata, por tanto, de un proceso de difusión de solventes, que ocurre de manera controlada y proporciona estabilidad al sistema, sin que exista la necesidad de crear enlaces covalentes entre los componentes.

Un procedimiento particular para la obtención de los sistemas de la invención (denominado en los ejemplos procedimiento de difusión de disolvente en una etapa), comprende:

a) preparar una disolución acuosa que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico (PGA), ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina

(PAsn) o una combinación de los mismos, y opcionalmente un tensoactivo soluble en agua;

- b) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite y un tensoactivo catiónico, y opcionalmente un tensoactivo soluble en aceite;
- 5 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 (denominado en los ejemplos procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas) que comprende recubrir una nanoemulsión catiónica con el polímero de recubrimiento mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa del polímero. Asimismo, la formación de la nanoemulsión puede favorecerse mediante ultrasonidos (denominado en los ejemplos procedimiento de sonicación) u
 10
 15 homogeneización (denominado en los ejemplos procedimiento de homogeneización).

En una realización particular, el proceso de incubación comprende mezclar la nanoemulsión catiónica con una disolución acuosa del polímero de recubrimiento.

Dicha nanoemulsión catiónica está constituida al menos por un aceite, un tensoactivo catiónico y una fase acuosa. La fase acuosa puede contener otros agentes
 20 tensoactivos, sales, y otros agentes auxiliares.

Los procedimientos de preparación de dicha nanoemulsión son conocidos en el estado de la técnica, 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).

25 Un procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión catiónica (denominado en los ejemplos procedimiento de difusión de disolvente) comprende:

- i) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite, un tensoactivo catiónico y opcionalmente un tensoactivo soluble en aceite

ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa que opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y que está bajo agitación para formar una nanoemulsión catiónica;

5 iii) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Otro procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión catiónica (denominado en los ejemplos procedimiento de sonicación) comprende:

i) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite, un tensoactivo catiónico y opcionalmente un tensoactivo soluble en aceite;

10 ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa que opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y sonicar;

iii) diluir con agua la emulsión obtenida en la fase ii);

iv) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

15 Otro procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión catiónica (denominado en los ejemplos procedimiento de homogeneización) comprende:

i) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite, un tensoactivo catiónico y opcionalmente un tensoactivo soluble en aceite;

20 ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa que opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y homogeneizar;

iii) diluir con agua la emulsión obtenida en la fase ii) y homogeneizar;

iv) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

25 Según realizaciones particulares de los procedimientos anteriores, si el ingrediente activo es lipofílico o anfifílico, dicho ingrediente activo se añade a la disolución orgánica de la etapa b) o de la etapa i). Según otras realizaciones particulares, si el ingrediente activo es hidrofílico, dicho ingrediente activo se añade a la disolución de la etapa a) o de la etapa ii). De manera preferida, dicho ingrediente activo hidrófilo se añade disuelto en una disolución acuosa. También es posible incorporar el

ingrediente activo hidrófilo mediante adsorción a la suspensión de nanocápsulas obtenidas en la etapa d) o tras el proceso de incubación una vez formadas las nanocápsulas.

La formación de las nanocápsulas se produce al mezclar volúmenes de las
5 soluciones mencionadas que contienen la nanoemulsión catiónica con disoluciones acuosas del polímero de recubrimiento en diferentes proporciones, variando la relación de polímero de recubrimiento.

En una realización particular, la proporción de PGA, PGA-PEG y HA se encuentra comprendida entre el 0,05 y el 12 % p/p (peso de polímero de
10 recubrimiento/peso de formulación, base seca). De forma preferida, la disolución acuosa de polímero de recubrimiento está compuesta por 0,1-25 mg/ml de dicho polímero.

En otra realización particular, la proporción de PAsn se encuentra comprendida entre el 2,5 y el 30 % p/p (peso de polímero de recubrimiento/peso de formulación, base
15 seca). De forma preferida, la disolución acuosa de este polímero de recubrimiento está compuesta por 1-60 mg/ml de dicho polímero.

El disolvente de la disolución orgánica es preferentemente una mezcla de disolventes polares tales como etanol y acetona pudiendo incluir además disolventes no polares como por ejemplo el diclorometano. En esta fase orgánica se incorpora el aceite y el tensoactivo catiónico, y opcionalmente el tensoactivo soluble en aceite. En una
20 composición particular se incorpora igualmente el ingrediente activo.

Un ejemplo particular para la obtención de los sistemas de nanocápsulas de la invención que comprenden PGA o PGA-PEG siguiendo el primer procedimiento descrito anteriormente comprende:

- a) preparar una disolución acuosa de 20 ml al 0,25 % p/v de poloxámero 188
25 en la que se disuelve de 0,1 a 25 mg/ml de ácido poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol;
- b) preparar una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona de lecitina y un tensoactivo catiónico (cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), a la que se le adiciona Miglyol® 812.

- 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.

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

- a) preparar una disolución acuosa de 10 ml de volumen en los que se disuelve de 0,5 a 25 mg de poliasparagina;
- 10 b) preparar una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona de lecitina y un tensoactivo catiónico (cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), a la que se le adiciona Miglyol® 812;
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- 15 d) opcionalmente, evaporar los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

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

- a) preparar una disolución acuosa de 20 ml al 0,25 % p/v de poloxámero 188 en la que se disuelve de 0,1 a 25 mg de ácido hialurónico;
- 20 b) preparar una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona de lecitina y un tensoactivo catiónico (cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), a la que se le adiciona Miglyol® 812.
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones resultantes de las etapas a) y b),
- 25 obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) opcionalmente, evaporar los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

El procedimiento de elaboración de los sistemas de nanocápsulas 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 trehalosa, 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.

De acuerdo con esta etapa adicional, la presente invención se refiere también a los sistemas de nanocápsulas que comprenden una cubierta de ácido poliglutámico, poliglutámico-polietilenglicol, poliasparagina o ácido hialurónico bajo forma de liofilizado.

Los sistemas de nanocápsulas aquí descritos presentan una estabilidad adecuada tanto en suspensión como bajo forma de liofilizado. Por otra parte, los estudios de estabilidad parecen indicar que tras su administración a organismos, humano o animal, no sufren un proceso rápido de agregación o destrucción, sino que previsiblemente permanecen bajo forma nanocapsular hasta alcanzar el tejido o célula diana.

Los sistemas de nanocápsulas de esta invención presentan ventajas en comparación con otros sistemas de administración y/o liberación de fármacos, debido a su comportamiento singular en cuanto a:

- 20 - la encapsulación/asociación de principios activos: el sistema puede incluir uno o más principios activos o sustancias adyuvantes, hidrofílicos o lipofílicos, en proporciones superiores a la de las nanopartículas, micelas, complejos, nanogeles.
- 25 - la liberación del principio activo: la cubierta ejerce una función en la velocidad de liberación del mismo, permitiendo liberar de forma controlada el principio activo según aplicación y necesidades.
- la estabilidad en fluidos biológicos: la cubierta polimérica confiere a los núcleos lipídicos una gran estabilidad, lo que representa una ventaja frente a otros sistemas de micro y nanoemulsiones.

- la interacción específica con determinadas superficies biológicas: la cubierta polimérica confiere a los núcleos lipídicos la posibilidad de interactuar con superficies mucosas así como con epitelios y células específicas.

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 en cuanto a su composición, propiedades y morfología, les convierte en excelentes candidatos para el área 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 lipofílico es docetaxel.

En una realización preferida, el ingrediente activo se selecciona entre un oligonucleótido, ARN de interferencia, un plásmido de ADN o un polinucleótido, más preferiblemente el ingrediente activo es un plásmido de ADN.

En otra realización preferida, el ingrediente activo es de naturaleza hidrofóbica, anfifílica o hidrofílica. Los ingredientes activos de naturaleza hidrofóbica o anfifílica preferentemente son añadidos en la etapa b) del procedimiento de preparación de nanocápsulas de la invención. Los ingredientes activos de naturaleza hidrofílica preferentemente son añadidos en la etapa a) del procedimiento o en una etapa posterior a la d) mediante un proceso de incubación. Sin embargo, la invención también contempla otras realizaciones como por ejemplo añadir en la etapa b) un ingrediente activo hidrófilo disuelto en un pequeño volumen de fase acuosa. A diferencia de los principios activos hidrofóbicos, que son encapsulados dentro de las nanocápsulas, los ingredientes activos de naturaleza hidrofílica se pueden asociar a la superficie de las mismas mediante adsorción.

Tal como se ha definido anteriormente, cuando el polímero comprendido en las nanocápsulas de la invención es ácido poliglutámico o ácido poliglutámico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemnina o una tamandarina.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por diferentes vías, tales como a través de mucosas, tópica o parenteralmente.

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, base seca, 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 lipofílico puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 10% en peso, preferentemente hasta aproximadamente el 5%.

10

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.

Tal como se ha definido anteriormente, la invención se refiere al uso de dicho sistema en la preparación de un medicamento. En una realización particular, dicho uso está relacionado con el tratamiento del cáncer.

20 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.

25 **Ejemplos**

A continuación se indica el significado de las abreviaturas utilizadas a lo largo de los ejemplos

PGA= Ácido poli-L-glutámico; la sal de PGA utilizada en los siguientes ejemplos fue el la sal de sodio de peso molecular de entre 15000 y 50000 Da (SIGMA).

PGA-PEG 16000 Da = Ácido poli-L-glutamico-polietilenglicol; la sal de PGA-PEG utilizada en los siguientes ejemplos fue la sal de sodio de peso molecular de 16000 Da, en particular con un porcentaje de peguicación del 6% y un tamaño de la cadena de PEG de 1000 Da (Alamanda Polymers USA).

- 5 PGA-PEG 22000 Da = Ácido poli-L-glutamico-polietilenglicol; la sal de PGA-PEG utilizada en los siguientes ejemplos fue la sal de sodio de peso molecular de 22000 Da, en particular con un porcentaje de peguicación del 93% y un tamaño de la cadena de PEG de 20000 Da (Alamanda Polymers USA).

- 10 PGA-PEG 35000 Da = Ácido poli-L-glutamico-polietilenglicol; la sal de PGA-PEG utilizada en los siguientes ejemplos fue la sal de sodio de peso molecular de 35000 Da, en particular con un porcentaje de peguicación del 60% y un tamaño de la cadena de PEG de 20000 Da (Alamanda Polymers USA).

- 15 HA = Ácido hialurónico; la sal de HA utilizada en los siguientes ejemplos fue el hialuronato de sodio de peso molecular de entre 20000 y 50000 Da y de 165000 Da. (Imquiaroma, Francia).

PAsn = Poliasparagina; la poliasparagina utilizada presenta preferentemente un peso molecular de 5000 a 15000 Da, con aproximadamente 5% de residuos de ácido aspártico (SIGMA).

BKC = Cloruro de benzalconio (SIGMA).

- 20 CTAB = Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (SIGMA).

DCX = Docetaxel (SIGMA).

- 25 Nanoemulsión (NE) = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos para referirse a los nanosistemas comprendidos por un lecitina, Miglyol® 812, un tensoactivo catiónico (cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), opcionalmente poloxámero 188 y cuya única diferencia con las nanocápsulas es la ausencia de un polímero de recubrimiento en la superficie de los sistemas.

Nanocápsulas (NCs) de PGA = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden lecitina, Miglyol® 812, cloruro de benzalconio, poloxámero 188 y PGA.

Nanocápsulas (NCs) de PGA-PEG = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden al copolímero PGA-PEG de distinto peso molecular y distinto porcentaje de peguización, lecitina, Miglyol® 812, cloruro de benzalconio, y poloxámero 188.

- 5 Nanocápsulas (NCs) de HA = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden lecitina, Miglyol® 812, un tensoactivo catiónico (cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), poloxámero 188 y HA.

- 10 Nanocápsulas (NCs) de PAsn = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden poliasparagina, lecitina, Miglyol® 812, un tensoactivo catiónico (cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y opcionalmente poloxámero 188.

15 Ejemplo 1

Evaluación de las características físico-químicas de las nanocápsulas de PGA y nanocápsulas de PGA-PEG en función de la cantidad de polímero.

- 20 Ejemplo 1.1. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de PGA o PGA-PEG según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,5:9 ml) de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (7 mg), a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812.
- 25 ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 20 ml de una solución acuosa al 0,25% p/v de poloxámero 188 bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión catiónica;
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante;
- 30 iv) se recubrió la nanoemulsión catiónica obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1,5 ml) compuesta por

0,1 a 25 mg/ml de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de distinto peso molecular, en una proporción 4:1,5 v/v (nanoemulsión:disolución de polímero), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

- 5 Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). Las tablas 1, 2, 3, 4 muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de poliglutámico y poliglutámico-polietilenglicol de distintos pesos moleculares en la etapa iv).

10

TABLA 1

Formulación	PGA etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA	100	X		
NC PGA	50	X		
NC PGA	25	X		
NC PGA	10	199 ± 7	0,1	-60 ± 1
NC PGA	5	196 ± 6	0,1	-54 ± 4
NC PGA	1	206 ± 6	0,1	-28 ± 3

X= no se forman las nanocápsulas

TABLA 2

Formulación	PGA-PEG 16000Da etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100	X		
NC PGA-PEG 16000Da	50	X		
NC PGA-PEG 16000Da	25	198 ± 4	0,1	-60 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	10	194 ± 8	0,1	-55 ± 2
NC PGA-PEG 16000Da	5	219 ± 15	0,2	-56 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	1	252 ± 6	0,2	-28 ± 6

X= no se forman las nanocápsulas

15

TABLA 3

Formulación	PGA-PEG 22000Da etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
-------------	-------------------------------	-------------	----	---------------------

NC PGA-PEG 22000Da	100	227 ± 6	0,1	-6 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	50	223 ± 1	0,1	-1 ± 2
NC PGA-PEG 22000Da	25	225 ± 9	0,1	+2 ± 3
NC PGA-PEG 22000Da	10	224 ± 2	0,1	+11 ± 2
NC PGA-PEG 22000Da	5	222 ± 1	0,1	+15 ± 4
NC PGA-PEG 22000Da	1	211 ± 3	0,1	+26 ± 1

TABLA 4

Formulación	PGA-PEG 35000Da etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	201 ± 10	0,1	-41 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	50	200 ± 8	0,1	-45 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	25	210 ± 12	0,2	-29 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	204 ± 3	0,1	-29 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	5	207 ± 7	0,1	-30 ± 12
NC PGA-PEG 35000Da	1	263 ± 5	0,1	+2 ± 1

5 Ejemplo 1.2. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- 10 a) se preparó una disolución acuosa (20 ml) en la que se disuelve de 0,5 a 25 mg/ml de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol que se encuentra al 0,25 % p/v de poloxámero 188;
- b) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,5:9 ml) de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (7 mg) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
- 15 c) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En las tablas 5, 6, 7 y 8 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol en la disolución acuosa de la etapa a).

5

TABLA 5

Formulación	PGA etapa a (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA	100	170 ± 14	0,1	-57 ± 52
NC PGA	50	155 ± 7	0,1	-57 ± 3
NC PGA	25	178 ± 5	0,0	-43 ± 2
NC PGA	10	202 ± 5	0,126	-45 ± 1,5
NC PGA	5	193 ± 25	0,1	-48 ± 1
NC PGA	1	217 ± 3	0,1	-25 ± 2

TABLA 6

Formulación	PGA-PEG 16000Da etapa a (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100	151 ± 5	0,1	-64 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	50	172 ± 8	0,2	-67 ± 3
NC PGA-PEG 16000Da	25	169 ± 4	0,1	-60 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	10	152 ± 3	0,1	-49 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	5	166 ± 4	0,1	-42 ± 3
NC PGA-PEG 16000Da	1	176 ± 5	0,1	-36 ± 2

TABLA 7

Formulación	PGA-PEG 22000Da etapa a (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 22000Da	100	227 ± 1	0,1	-0,5 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	50	242 ± 1	0,1	+3 ± 4
NC PGA-PEG 22000Da	25	235 ± 6	0,1	+13 ± 2
NC PGA-PEG 22000Da	10	222 ± 5	0,1	+16 ± 2
NC PGA-PEG 22000Da	5	215 ± 1	0,1	+25 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	1	221 ± 2	0,1	+21 ± 5

10

TABLA 8

Formulación	PGA-PEG 35000Da etapa a (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	174 ± 4	0,1	-42 ± 3
NC PGA-PEG 35000Da	50	188 ± 6	0,1	-39 ± 3
NC PGA-PEG 35000Da	25	178 ± 5	0,1	-43 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	170 ± 2	0,1	-26 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	5	192 ± 2	0,1	-15 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	1	170 ± 4	0,1	-18 ± 2

Ejemplo 1.3. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso
 5 recubierto de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol según el procedimiento de
 sonicación:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (7 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
- 10 ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua conteniendo poloxámero 188 al 0,25 % p/v, 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 catiónica; y
- 15 v) se recubrió la nanoemulsión catiónica obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1,5 ml) compuesta por 0,1 a 25 mg/ml de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol, en una proporción 4:1,5 (nanoemulsión:disolución de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol), produciéndose de forma inmediata el
 20 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 las tablas 9, 10, 11 y 12 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol en la etapa v).

TABLA 9

Formulación	PGA etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA	100		X	
NC PGA	50		X	
NC PGA	25		X	
NC PGA	10	195 ± 1	0,1	-62 ± 4
NC PGA	5	192 ± 2	0,1	-64 ± 1
NC PGA	1	194 ± 4	0,1	-27 ± 2

X= no se forman las nanocápsulas

TABLA 10

Formulación	PGA-PEG 16000Da etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100		X	
NC PGA-PEG 16000Da	50		X	
NC PGA-PEG 16000Da	25	202 ± 25	0,2	-60 ± 2
NC PGA-PEG 16000Da	10	194 ± 5	0,1	-57 ± 3
NC PGA-PEG 16000Da	5	193 ± 4	0,1	-59 ± 2
NC PGA-PEG 16000Da	1	243 ± 15	0,1	-22 ± 7

5 X= no se forman las nanocápsulas

TABLA 11

Formulación	PGA-PEG 22000Da etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 22000Da	100	195 ± 5	0,1	-6 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	50	180 ± 12	0,1	-4 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	25	175 ± 9	0,1	-1 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	10	174 ± 11	0,1	+6 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	5	172 ± 12	0,1	+10 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	1	132 ± 10	0,3	+25 ± 1

TABLA 12

Formulación	PGA-PEG 35000Da etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	203 ± 10	0,1	-45 ± 1

NC PGA-PEG 35000Da	50	205 ± 1	0,1	-41 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	25	206 ± 3	0,1	-40 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	209 ± 4	0,2	-31 ± 4
NC PGA-PEG 35000Da	5	200 ± 15	0,1	-2,2 ±
NC PGA-PEG 35000Da	1	224 ± 3	0,1	+1 ± 1

Ejemplo 1.4. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol según el procedimiento de homogeneización:

- 5 i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (7 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
- ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua conteniendo 0,25 % p/v de poloxámero 188 y se homogeneizó a 16.000 rpm durante 5 minutos y posteriormente a 19.000 rpm durante otros 5 minutos;
- 10 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 catiónica; y
- 15 v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1,5 ml) compuesta por 0,1 a 25 mg/ml de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de sodio, en una proporción 4:1,5 (nanoemulsión:disolución de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.
- 20

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En las tablas 13, 14, 15 y 16 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol en la etapa v).

25

TABLA 13

Formulación	PGA etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA	100		X	
NC PGA	50		X	
NC PGA	25		X	
NC PGA	10	187 ± 7	0,2	-65 ± 5
NC PGA	5	184 ± 10	0,2	-55 ± 1
NC PGA	1	234 ± 7	0,3	-22 ± 1

X= no se forman las nanocápsulas

TABLA 14

Formulación	PGA-PEG 16000Da etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100		X	
NC PGA-PEG 16000Da	50		X	
NC PGA-PEG 16000Da	25	199 ± 17	0,2	-69 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	10	197 ± 7	0,1	-63 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	5	202 ± 15	0,2	-54 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	1	206 ± 8	0,5	-22 ± 1

X= no se forman las nanocápsulas

5

TABLA 15

Formulación	PGA-PEG 22000Da etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 22000Da	100	201 ± 2	0,1	-8 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	50	199 ± 1	0,2	-2 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	25	202 ± 8	0,2	+4 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	10	210 ± 11	0,3	+14 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	5	195 ± 1	0,2	+17 ± 3
NC PGA-PEG 22000Da	1	201 ± 7	0,3	+35 ± 1

TABLA 16

Formulación	PGA-PEG 35000Da etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	189 ± 14	0,2	-42 ± 2

NC PGA-PEG 35000Da	50	186 ± 7	0,2	-33 ± 7
NC PGA-PEG 35000Da	25	206 ± 20	0,2	-37 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	197 ± 17	0,2	-37 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	5	194 ± 1	0,2	-24 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	1	216 ± 20	0,2	+7 ± 1

Ejemplo 2

5 Evaluación de la capacidad de encapsulación del fármaco lipofílico docetaxel en nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da

Se prepararon nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da en forma de sal de sodio, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (7 mg) y poloxámero 188. Se procedió a la incorporación de un fármaco lipofílico, tomando para ello el docetaxel, un 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 se rotaevapora el sistema hasta obtener un volumen constante y se incuba con una solución de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da formándose las nanocápsulas encapsulando docetaxel con relaciones de peso de docetaxel/nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da de hasta el 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 de $\approx 60\%$. También se midieron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 17).

TABLA 17

Formulación	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC PGA	160 ± 4	0,1	-47 ± 2
NC PGA-PEG 35000 Da	180 ± 4	0,1	-20 ± 4

25 Ejemplo 3

Evaluación del tamaño de partícula de la formulación de nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da durante su almacenamiento

Se prepararon nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da en forma de sal de sodio, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol®
5 812, y cloruro de benzalconio (7 mg) y poloxámero 188 según el procedimiento previamente descrito. Se realizaron medidas de tamaño de partícula durante un tiempo pertinente, 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 (37°C) sobre la estabilidad de las nanocápsulas. Los resultados presentados en la figuras 1a y
10 1b muestran la escasa variabilidad del tamaño de las nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol de 35000 Da al 5,8 % p/p, durante el almacenamiento.

Ejemplo 4

Evaluación del efecto del crioprotector trehalosa sobre el tamaño de partícula de las
15 nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol tras el proceso de liofilización

Se prepararon nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol en forma de sal de sodio, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (7 mg) y poloxámero 188, según el
20 procedimiento previamente descrito. Se evaluó el efecto que tiene el agente crioprotector trehalosa durante el proceso de liofilización de las nanocápsulas de poliglutamico o poliglutamico-polietilenglicol y en la posterior recuperación del tamaño de partícula tras la resuspensión ensayando dos concentraciones de trehalosa, 5 y 10% p/v. Asimismo, se evaluó la influencia de la concentración de nanocápsulas (0,025 hasta
25 1% p/v) en la suspensión a liofilizar. Los resultados de la figura 2a y 2b muestran el tamaño de partícula de las nanocápsulas de poliglutámico o poliglutámico-polietilenglicol tras la resuspensión.

Ejemplo 5

Evaluación de las características físico-químicas de las nanocápsulas de HA y
30 nanocápsulas de HA-PEG en función de la cantidad de polímero.

Ejemplo 5.1. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de HA según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,5:9 ml) de lecitina (30 mg) y los tensoactivos catiónicos cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg), a la que se le adiciona 125 μ l de Miglyol® 812.
- ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 20 ml de una solución acuosa al 0,25% p/v de poloxámero 188 bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión catiónica;
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante;
- iv) se recubrió la nanoemulsión catiónica obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1,5 ml) compuesta por 0,1 a 25 mg de hialuronato de sodio, en una proporción 4:1,5 (nanoemulsión:disolución de HA), 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) y se tomaron fotos de las nanocápsulas mediante microscopía electrónica de transmisión (figura 3). En las tablas 18 y 19 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de HA de 20000-50000 Da en la etapa iv) y utilizando cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio, respectivamente. La tabla 20 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de HA de 160000 Da en la etapa iv) y utilizando cloruro de benzalconio.

TABLA 18

Formulación	HA etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	223 \pm 10	0,1	27 \pm 3
NCs HA	25	252 \pm 19	0,1	-46 \pm 2
NCs HA	12,5	235 \pm 13	0,1	-45 \pm 4
NCs HA	6,25	248 \pm 10	0,2	-42 \pm 2
NCs HA	0,5	249 \pm 10	0,2	9 \pm 2

TABLA 19

Formulación	HA etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	215 ± 7	0,1	35 ± 2
NCs HA	12,5	260 ± 20	0,2	-31 ± 3
NCs HA	6,25	238 ± 3	0,1	-37 ± 2
NCs HA	3,125	238 ± 2	0,1	-35 ± 2
NCs HA	0,1	231 ± 8	0,1	18 ± 2

TABLA 20

Formulación	HA etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	207 ± 5	0,1	27 ± 3
NCs HA	25	410 ± 70	0,5	-59 ± 6
NCs HA	12,5	294 ± 40	0,4	-62 ± 8
NCs HA	6,25	256 ± 11	0,5	-52 ± 8
NCs HA	1	271 ± 53	0,5	3 ± 1
NCs HA	0,5	235 ± 10	0,2	27 ± 3

5

Ejemplo 5.2. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleosorecubierto de HA según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- 10 a) se preparó una disolución acuosa de hialuronato de sodio (20 ml) en la que se disuelve de 0,5 a 25 mg de HA de 20000-50000 Da y que se encuentra al 0,25 % p/v de poloxámero 188;
- b) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,5:9 ml) de lecitina (30 mg) y los tensoactivos catiónicos cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812.
- 15 c) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En las tablas 21 y 22 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de HA en la disolución acuosa de la etapa a) utilizando cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio, respectivamente.

TABLA 21

Formulación	HA etapa a (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NCs HA	25	186 ± 6	0,1	-47 ± 2
NCs HA	12,5	185 ± 4	0,1	-44 ± 2
NCs HA	0,5	251 ± 5	0,1	37 ± 1

TABLA 22

Formulación	HA etapa a (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NCs HA	12,5	273 ± 12	0,2	-35 ± 2
NCs HA	6,25	170 ± 6	0,1	-35 ± 1
NCs HA	3,125	168 ± 3	0,1	-35 ± 2
NCs HA	0,1	228 ± 17	0,1	33 ± 3

- 10 Ejemplo 5.3. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de HA según el procedimiento de sonicación:
- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (4 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
 - 15 ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua conteniendo poloxámero 188 al 0,25 % p/v, 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 catiónica; y
 - 20 v) se recubrió la nanoemulsión catiónica obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1ml - 5 ml) compuesta por 0,5 a 25 mg de hialuronato de sodio, en una proporción 4:1,5 v/v

(nanoemulsión:disolución de HA), 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 23 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de HA en etapa v).

TABLA 23

Formulación	HA etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	162 ± 3	0,2	40 ± 4
NCs HA	25	200 ± 3	0,2	-43 ± 6
NCs HA	12,5	179 ± 5	0,1	-47 ± 2
NCs HA	6,25	185 ± 2	0,2	-43 ± 2
NCs HA	0,5	177 ± 1	0,2	14 ± 2

Ejemplo 5.4. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de HA según el procedimiento de homogeneización:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (4 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
- ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua conteniendo 0,25 % p/v de poloxamero 188 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 catiónica; y
- v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1,5 ml) compuesta por 0,5 a 25 mg de hialuronato de sodio, en una proporción 4:1,5

(nanoemulsión:disolución de HA), 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 24 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de HA en la etapa v).

TABLA 24

Formulación	HA etapa v (mg)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NE	-	141 ± 9	0,3	49 ± 1
NCs HA	25	166 ± 18	0,2	-44 ± 2
NCs HA	12,5	143 ± 3	0,2	-42 ± 3
NCs HA	0,5	214 ± 5	0,3	37 ± 6

Ejemplo 6

10 Evaluación de la capacidad de encapsulación del fármaco lipofílico docetaxel en nanocápsulas de HA

Se prepararon nanocápsulas de HA en forma de sal de sodio, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y los tensoactivos catiónicos cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg) y poloxámero 188.

15 Se procedió a la incorporación de un fármaco lipofílico, tomando para ello el docetaxel, un agente antitumoral prácticamente insoluble en agua. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 5.1, 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 se rotaevapora

20 el sistema hasta obtener un volumen constante y se incuba con una solución de HA formándose las nanocápsulas de HA encapsulando docetaxel con relaciones de peso de docetaxel/nanocápsulas de HA de hasta el 4 %.

Una vez preparadas las nanocápsulas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando el fármaco libre mediante

25 cromatografía líquida de alta resolución, con $\lambda=227\text{nm}$), obteniéndose una eficacia de encapsulación de $\approx 65\%$. También se midieron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 25).

TABLA 25

Formulación	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
NC BKC-HA	235 ± 13	0,1	-45 ± 4
NC BKC-HA/DCX	250 ± 20	0,1	-52 ± 11
NC CTAB-HA	267 ± 23	0,1	-31 ± 3
NC CTAB-HA/DCX	276 ± 1	0.1	-36 ± 1

Ejemplo 7

Liberación del fármaco docetaxel de las nanocápsulas de HA

5 Se prepararon nanocápsulas de HA encapsulando el fármaco lipofílico docetaxel siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 6. Las nanocápsulas fueron diluidas en agua e incubadas en este medio en agitación horizontal (100 rpm) a 37°C. A diversos tiempos se tomaron muestras de los medios de incubación y se aislaron las nanocápsulas en suspensión mediante ultracentrifugación. Finalmente se valoró la fracción de fármaco liberado cuantificando la cantidad de fármaco libre en el líquido infranadante la que se cotejó con aquella fracción del fármaco que permanecía unida a las nanocápsulas. La cuantificación del docetaxel se realizó según lo descrito en el ejemplo 6. El perfil de cesión del fármaco de las nanocápsulas de HA se recoge en la figura 4.

15 Ejemplo 8

Evaluación del tamaño de partícula de la formulación de nanocápsulas de HA durante su almacenamiento

Se prepararon nanocápsulas de HA en forma de sal de sodio, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y cloruro de benzalconio (4 mg) o hexadeciltrimetilamonio (5,4 mg) y poloxámero 188 según el procedimiento previamente descrito. Se realizaron medidas de tamaño de partícula durante un tiempo pertinente, 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 5a y 5b muestran la escasa variabilidad del tamaño de las nanocápsulas de HA al 5,8 % p/p con cloruro de benzalconio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio respectivamente, durante el almacenamiento.

Ejemplo 9

Evaluación del efecto del crioprotector trehalosa sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas de HA tras el proceso de liofilización

5 Se prepararon nanocápsulas de HA en forma de sal de sodio, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (4 mg) y poloxámero 188, según el procedimiento previamente descrito. Se evaluó el efecto que tiene el agente crioprotector trehalosa durante el proceso de liofilización de las nanocápsulas de HA y en la posterior recuperación del tamaño de partícula tras la
10 resuspensión ensayando dos concentraciones de trehalosa, 5 y 10% p/v. Asimismo, se evaluó la influencia de la concentración de nanocápsulas (0,25, 0,5 y 1% p/v) en la suspensión a liofilizar. Los resultados de la figura 6 muestran el tamaño de partícula de las nanocápsulas de HA liofilizadas tras la resuspensión.

15 Ejemplo 10

Estudio de la capacidad de inhibición de la proliferación celular de las nanocápsulas de HA

 Con el fin de evaluar el potencial de las nanocápsulas de HA que encapsulan la molécula citostática docetaxel para inhibir la proliferación celular de la línea de cáncer
20 de pulmón NCI-H460, se prepararon las nanocápsulas de HA utilizando bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1.8 mg) según el procedimiento descrito en el ejemplo 6. Los resultados recogidos en la figura 7 muestran la mayor capacidad de inhibición de la proliferación de las nanocápsulas que encapsulan docetaxel en comparación con la molécula libre cuando los sistemas se ponen en contacto durante 2 y 48 h con las células
25 cancerígenas. Por otra parte, se puede apreciar la inocuidad de los sistemas sin docetaxel. Los valores de IC₅₀, concentración a la cual se produce el 50% de la mortalidad de la población, fueron calculados mediante el programa Graph Pad Prism 2.1 (Graph Pad Software). De este modo, la solución de docetaxel presentó valores de IC₅₀ de 105 y 36 nM al estar en contacto con las células durante 2 y 48
30 respectivamente; mientras que las formulaciones de nanocápsulas de HA encapsulando docetaxel presentaron valores de ≈ 29 y ≈ 13 nM en los mismos tiempos de incubación,

resultando la nanoencapsulación del docetaxel 3,6 y 2,8 veces más efectiva en la inhibición de la proliferación celular.

5 Ejemplo 11

Evaluación de las características físico-químicas de las nanocápsulas de PAsn en función de la cantidad de polímero.

Ejemplo 11.1. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de PAsn según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- 10 i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,5:9 ml) de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg), a la que se le adiciona 0,125 ml de Miglyol® 812.
- 15 ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de agua bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión catiónica;
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante;
- 20 iv) se recubrió la nanoemulsión catiónica obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por distintas cantidades de PAsn, en una proporción 3,7:1, produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, de manera independiente a la temperatura.

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 (figura 8). En la tablas 26 y 27 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PAsn en la etapa iv) y utilizando cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,4 mg), respectivamente.

30

TABLA 26

Formulación	PAsn etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
NE	-	215 ± 7	0.1	34 ± 3
NCs PAsn	100	253 ± 16	0.2	-36 ± 9
NCs PAsn	50	250 ± 13	0.1	-36 ± 6
NCs PAsn	25	243 ± 19	0.1	-39 ± 2
NCs PAsn	10	235 ± 5	0.1	-33 ± 4
NCs PAsn	5	262 ± 3	0.1	-19 ± 2
NCs PAsn	1	370 ± 13	0.2	10 ± 2

TABLA 27

Formulación	PAsn etapa iv (mg)	Tamaño (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
NE	-	208 ± 10	0.1	40 ± 3
NCs PAsn	100	270 ± 5	0.2	-15 ± 9
NCs PAsn	50	263 ± 8	0.2	-20 ± 6
NCs PAsn	25	249 ± 19	0.2	-23 ± 2
NCs PAsn	10	214 ± 9	0.1	-24 ± 4
NCs PAsn	5	290 ± 3	0.2	-8 ± 2
NCs PAsn	1	339 ± 16	0.2	10 ± 2

5 Ejemplo 11.2. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de PAsn según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- a) se preparó una disolución acuosa de poliasparagina (20 ml) en la que se disuelve distintas cantidades del poliaminoácido, 5-200 mg;
- b) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,5:9 ml) de lecitina (30 mg) y los tensoactivos catiónicos cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
- c) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tablas 28 y 29 se muestran los

valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PAsn en la disolución acuosa de la etapa a) utilizando cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio, respectivamente.

TABLA 28

Formulación	PAsn etapa a (mg)	Tamaño (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
NCs PAsn	10	-	-	-
NCs PAsn	50	323 ± 16	0.2	-23 ± 13
NCs PAsn	25	250 ± 7	0.2	-20 ± 6
NCs PAsn	10	215 ± 9	0.1	-18 ± 1
NCs PAsn	5	196 ± 9	0.2	-6 ± 1
NCs PAsn	1	356 ± 6	0.2	13 ± 5

5

TABLA 29

Formulación	PAsn etapa a (mg)	Tamaño (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
NCs PAsn	10	-	-	-
NCs PAsn	50	366 ± 5	0.3	-22 ± 6
NCs PAsn	25	260 ± 4	0.2	-20 ± 7
NCs PAsn	10	173.9 ± 5	0.1	-24 ± 3
NCs PAsn	5	140 ± 3	0.2	-14 ± 2
NCs PAsn	1	332 ± 9	0.2	13 ± 6

10 Ejemplo 11.3. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de PAsn según el procedimiento de sonicación:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (4 mg) o CTAB (1.8 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 200 µl de Miglyol® 812;
- 15 ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua y se sonicó durante 30 segundos;
- iii) se diluyó la emulsión obtenida con agua (dilución 1:10);
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante para formar una nanoemulsión catiónica; y
- 20 v) se recubrió la nanoemulsión catiónica obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por

distintas cantidades de poliasparagina, en una proporción 4:1 (nanoemulsión:disolución de PAsn), 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 30 se muestran los valores obtenidos.

Ejemplo 11.4. Se prepararon nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso recubierto de poliasparagina según el procedimiento de homogeneización:

- 10 i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de lecitina (30 mg) y el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio (4 mg) o CTAB (1,8 mg) en diclorometano (1 ml) a la que se le adiciona 125 µl de Miglyol® 812;
- 15 ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua y se homogeneizó a 16.000 rpm durante 5 minutos y posteriormente a 19.000 rpm durante otros 5 minutos;
- 20 iii) se diluyó la emulsión obtenida con agua (dilución 1:10) y se homogeneizó durante 3 minutos a 22.000 rpm;
- 25 iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante para formar una nanoemulsión catiónica; y
- v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por distintas cantidades de PAsn, en una proporción 4:1 (nanoemulsión:disolución de PAsn), 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 30 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados.

TABLA 30

Método	TA	Cantidad TA (mg)	Cantidad PAsn	Tamaño (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)
--------	----	------------------	---------------	-------------	----	---------------------

Sonicación	CTAB	1.8	1 mg/mL	226 ± 5	0,1	-30 ± 4
Sonicación	BKC	4	1 mg/mL	242 ± 3	0,2	-37 ± 5
Homogeneización	CTAB	1.8	1 mg/mL	236 ± 2	0,1	-31 ± 1
Homogeneización	BKC	4	1 mg/mL	254 ± 3	0,2	-34 ± 6

Ejemplo 12

Evaluación de la capacidad de encapsulación del fármaco lipofílico docetaxel en nanocápsulas de poliasparagina

5 Se prepararon nanocápsulas de PAsn, con un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y los tensoactivos catiónicos cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg). Se procedió a la incorporación de un fármaco lipofílico, el docetaxel, un agente antitumoral prácticamente insoluble en agua. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en

10 el ejemplo 11.1., con una ligera modificación, una pequeña alícuota de una solución del ingrediente activo en etanol (1-100 mg/ml) es incorporada a la fase oleosa. Posteriormente se rotaevapora el sistema hasta obtener un volumen constante y se incubaba con una solución de PAsn formándose las nanocápsulas encapsulando docetaxel con relaciones de peso de docetaxel/nanocápsulas de PAsn de hasta un 30%.

15 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, $\lambda=227\text{nm}$), obteniéndose una eficacia de encapsulación de $\approx 75\%$. También se midieron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 31).

20

TABLA 31

Formulación	Tamaño (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)	% Asociación
NC BKC-PAsn	254 ± 6	0,1	-33 ± 6	-
NC BKC-PAsn DCX	249 ± 7	0,1	-36 ± 11	75 ± 3
NC CTAB-PAsn	235 ± 7	0,1	-28 ± 3	-
NC CTAB-PAsn DCX	236 ± 12	0.1	-32 ± 8	76 ± 2

Ejemplo 13

Liberación del fármaco docetaxel de las nanocápsulas de poliasparagina

Se elaboraron nanocápsulas de poliasparagina encapsulando el fármaco lipofílico docetaxel siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 12. Las nanocápsulas fueron diluidas en agua e incubadas en este medio en agitación horizontal (100 rpm) a 37°C. A diversos tiempos se tomaron muestras de los medios de incubación y se aislaron las nanocápsulas en suspensión mediante ultracentrifugación. Finalmente se valoró indirectamente la fracción de fármaco liberado cuantificando la cantidad de fármaco encontrada fuera de las nanocápsulas. La cuantificación del docetaxel se realizó según lo descrito en el ejemplo 12. El perfil de liberación del fármaco de las nanocápsulas de PAsn se recoge en la figura 9.

10

Ejemplo 14

Evaluación de la variación del tamaño de partícula de la formulación de nanocápsulas de poliasparagina durante su almacenamiento

Se prepararon nanocápsulas de poliasparagina, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y cloruro de benzalconio (4 mg) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (4 mg) según el procedimiento previamente descrito. Se realizaron medidas de tamaño de partícula durante un largo periodo de tiempo, con el fin de obtener información acerca de la evolución del tamaño 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 10a y 10b muestran la escasa variabilidad del tamaño de las nanocápsulas de PAsn con cloruro de benzalconio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio respectivamente, durante el almacenamiento.

25 Ejemplo 15

Evaluación del efecto la trehalosa y la glucosa sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas de PAsn tras el proceso de liofilización

Se prepararon nanocápsulas de poliasparagina, un núcleo oleoso compuesto por lecitina, Miglyol® 812 y el tensoactivo catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg), según el procedimiento previamente descrito. Se evaluó el efecto que tiene el agente crioprotector trehalosa durante el proceso de liofilización de las nanocápsulas de PAsn y en la posterior recuperación del tamaño de partícula tras la resuspensión

ensayando dos concentraciones de crioprotector, 5 y 10% p/v. Asimismo, se evaluó la influencia de la concentración de nanocápsulas (0,25, 0,5 y 1% p/v) en la suspensión a liofilizar. Los resultados de la Tabla 32 muestran el tamaño de partícula de las nanocápsulas de PAsn liofilizadas tras la resuspensión.

5

TABLA 32

[NC] %	[CRIO] %	Tamaño	SD
GLUCOSA			
0,125	0,25	342,7	8,856
0,125	1	293,5	7,862
0,25	0,5	302,6	8,271
0,5	0,5	322,9	6.795
0,5	1	314,8	7.808
TREHALOSA			
0,125	0,25	352,2	9,419
0,125	0,5	238,3	0,459
0,125	1	260,4	1,752
0,25	0,25	269,1	26,41
0,25	0,5	245,4	1,419
0,25	1	236,1	3,045
0,5	0,25	380,5	20,22
0,5	0,5	258	4,07
0,5	1	236,5	2,285

Ejemplo 16

Estudio de la capacidad de inhibición de la proliferación celular de las nanocápsulas de10 PAsn

Con el fin de evaluar el potencial de las nanocápsulas de PAsn que encapsulan el docetaxel para inhibir la proliferación celular de la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460, se prepararon las nanocápsulas de PAsn utilizando bromuro de hexadeciltrimetilamonio (1,8 mg) según el procedimiento descrito en el ejemplo 12. Los resultados recogidos en la figura 11 muestran la mayor capacidad de inhibición de la proliferación de las nanocápsulas que encapsulan docetaxel en comparación con la molécula libre cuando los sistemas se ponen en contacto durante 2 y 48 h con las células cancerosas. Por otra parte, se puede apreciar la inocuidad de los sistemas sin docetaxel. Los valores de IC50, fueron calculados mediante el programa Graph Pad Prism 2.1 (Graph Pad Software). De este modo, la solución de docetaxel presentó valores de IC50

de 105 y 36 nM al estar en contacto con las células durante 2 y 48 respectivamente; mientras que las formulaciones de nanocápsulas de PAsn encapsulando docetaxel presentaron valores de ≈ 30 y ≈ 13 nM en los mismos tiempos de incubación, resultando la nanoencapsulación del docetaxel 3,5 y 2,8 veces más efectiva en la inhibición de la

5 proliferación celular.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la administración de ingredientes activos que comprende nanocápsulas que comprenden un aceite, un tensoactivo catiónico y un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico (PGA), ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina (PAsn) o una combinación de los mismos, y opcionalmente un ingrediente activo,
5 con la condición de que cuando dicho sistema de nanocápsulas incluye ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemnina o una tamandarina.
10
2. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tensoactivo catiónico se selecciona entre cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltiridinio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de trimetiltetradecilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio y poloxaminas o mezclas de los mismos.
15
3. Sistema según la reivindicación 2, donde dicho tensoactivo catiónico es cloruro de benzalconio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el aceite se selecciona entre aceite mineral, aceite de escualeno, aceites de sabor, aceite de silicona, aceites esenciales, vitaminas insolubles en agua, isopropil estearato, butil estearato,
20 octil palmitato, cetil palmitato, tridecil behenato, diisopropil adipato, dioctil sebacato, mentil antranilato, cetil octanoato, octil salicilato, isopropil miristato, cetoles de dicarpato de neopentilglicol, Cerafilos®, decil oleato, C₁₂-C₁₅ alquil lactatos, cetil lactato, lauril lactato, isostearil neopentanoato, miristil lactato, isocetil estearoil estearato, octildodecil estearoil estearato, aceites de hidrocarburos, isoparafina, parafinas fluidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de colza, aceite de chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de lino, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palma fraccionado, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de semilla de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de salvado de arroz, cártamo, aceite de
25 30 té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de

macadamia, aceite de germen de trigo, aceite de almendra, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de girasol, aceite de cáñamo, aceite de bois, aceite de nuez de Kukui, aceite de aguacate, aceite de nuez, aceite de pescado, aceite de baya, aceite de pimienta de Jamaica, aceite de enebro, aceite de semilla, aceite de semilla de almendra, aceite de semilla de anís, aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez moscada, aceite de hoja de albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela, aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón, aceite de hoja de melaleuca, aceite de orégano, aceite de hoja de pachuli, aceite de hoja de menta, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de menta verde, aceite de hoja del árbol de té, aceite de hoja de tomillo, aceite de hoja de té de Canadá, aceite de flor, aceite de camomila, aceite de salvia romana, aceite de clavo, aceite de flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de flor de jazmín, aceite de flor de lavanda, aceite de flor de mauka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja, aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza de casia, aceite de corteza de canela, aceite de corteza de sazafrán, aceite de madera, aceite de madera de alcanfor, aceite de madera de cedro, aceite de palo de rosa, aceite de sándalo, aceite de madera de jengibre, aceite de resina, aceite de recino, aceite de mirra, aceite de piel, aceite de piel de Bérnago, aceite de piel de pomelo, aceite de piel de limón, aceite de piel de lima, aceite de piel de naranja, aceite de piel de mandarina, aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido linoleico, oleil alcohol, alcohol de isostearilo, oleato de etilo, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol® y Maisine®, derivados sintéticos o semisintéticos de los mimos y combinaciones de los mismos.

5. Sistema según la reivindicación 4, donde dicho aceite es Miglyol®.
- 25 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende un tensoactivo soluble en aceite.
7. Sistema según la reivindicación 6, donde el tensoactivo soluble en aceite es un fosfolípido seleccionado entre lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.
- 30 8. Sistema según la reivindicación 7, donde dicho fosfolípido es lecitina.

9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende un tensoactivo soluble en agua.
10. Sistema según la reivindicación 9, donde el tensoactivo soluble en agua es seleccionado entre poloxámero y polisorbatos.
- 5 11. Sistema según la reivindicación 10, donde dicho poloxámero es poloxámero 188.
12. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ingrediente activo se selecciona entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos y nucleótidos o bien combinaciones de los mismos.
- 10 13. Sistema según la reivindicación 12, donde el ingrediente activo es docetaxel.
14. Sistema según la reivindicación 12, donde el ingrediente activo se selecciona entre un oligonucleótido, ARN de interferencia, un plásmido de ADN o un polinucleótido.
15. Sistema según la reivindicación 14, donde el ingrediente activo es un plásmido de ADN.
- 15 16. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se encuentra en forma liofilizada.
17. Procedimiento de obtención del sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende:
 - 20 a) preparar una disolución acuosa que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico (PGA), poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), ácido hialurónico (HA) y poliasparagina (PAsn) o una combinación de los mismos, y opcionalmente un tensoactivo soluble en agua;
 - 25 b) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite y un tensoactivo catiónico, y opcionalmente un tensoactivo soluble en 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.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, que además comprende añadir un ingrediente activo, con la condición de que cuando dicho polímero incluye ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemnina o una tamandarina.
- 5 19. Procedimiento de obtención del sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende recubrir una nanoemulsión, constituida al menos por un aceite, un tensoactivo catiónico, opcionalmente un tensoactivo soluble en aceite y una fase acuosa que opcionalmente comprende un tensoactivo soluble en agua, mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa de ácido poliglutámico, poliglutamico-polietilenglicol, ácido hialurónico, poliasparagina o una mezcla de los mismos.
- 10 20. Procedimiento según la reivindicación 19, que además comprende añadir un ingrediente activo, con la condición de que cuando dicho polímero incluye ácido poliglutámico o ácido poliglutamico-polietilenglicol (PGA-PEG), entonces el ingrediente activo no es una didemnina o una tamandarina.
- 15 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que a continuación comprende una etapa de liofilización de los sistemas obtenidos en presencia de crioprotectores.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, que a continuación comprende una etapa para regenerar los sistemas liofilizados.
- 20 23. Composición farmacéutica que comprende el sistema definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, en donde dicha composición es para administración tópica, parenteral o a través de mucosas.
- 25 25. Uso de un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 16 en la preparación de un medicamento.
26. Uso de un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

FIGURA 1a

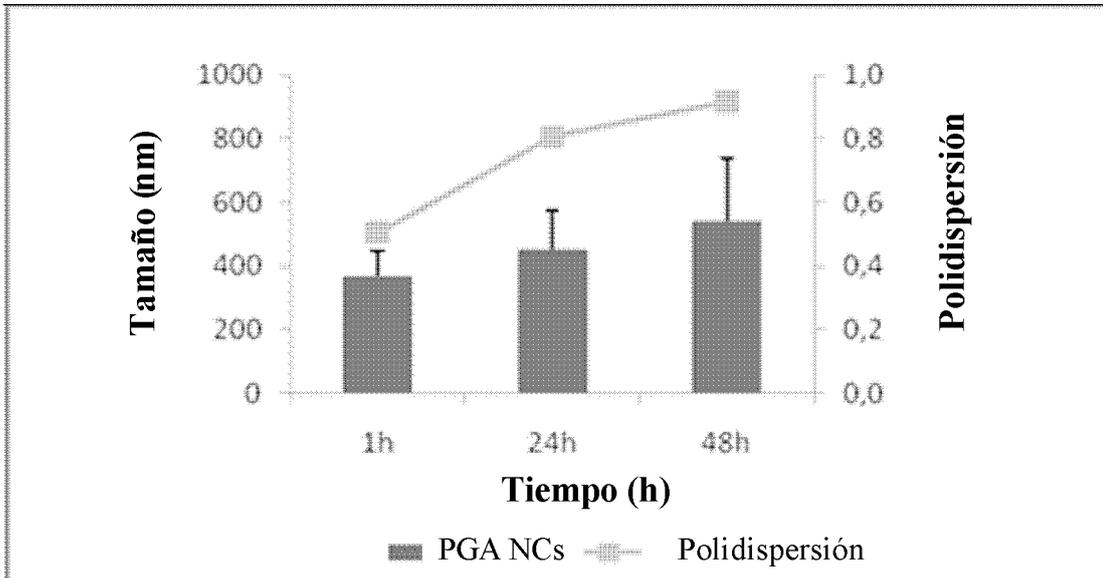


FIGURA 1b

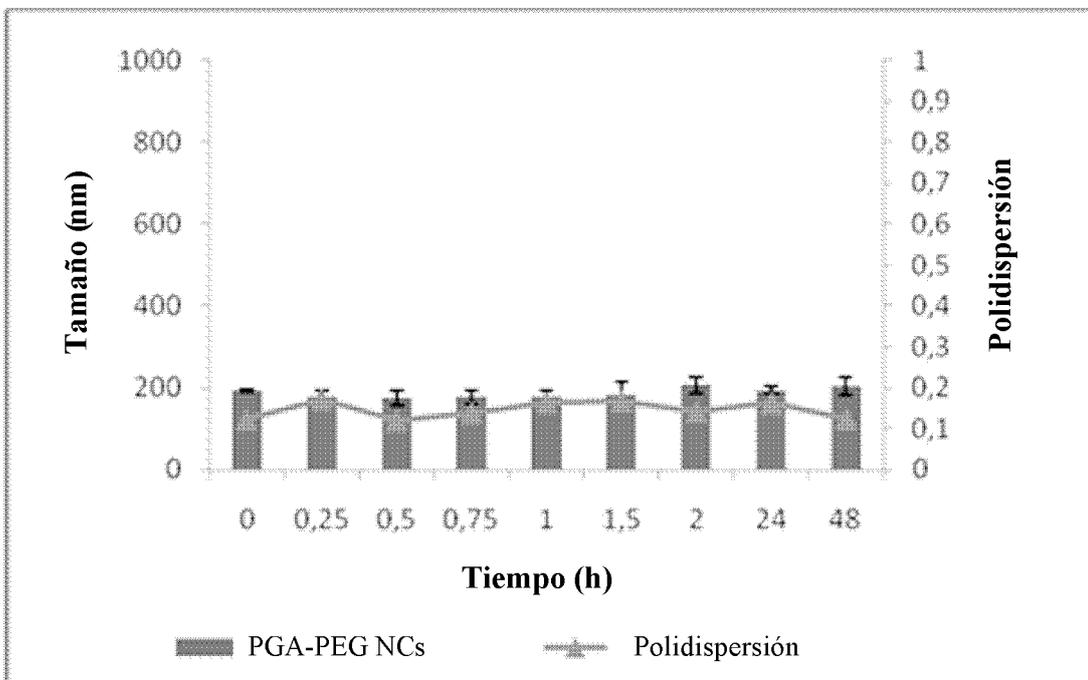


FIGURA 2a

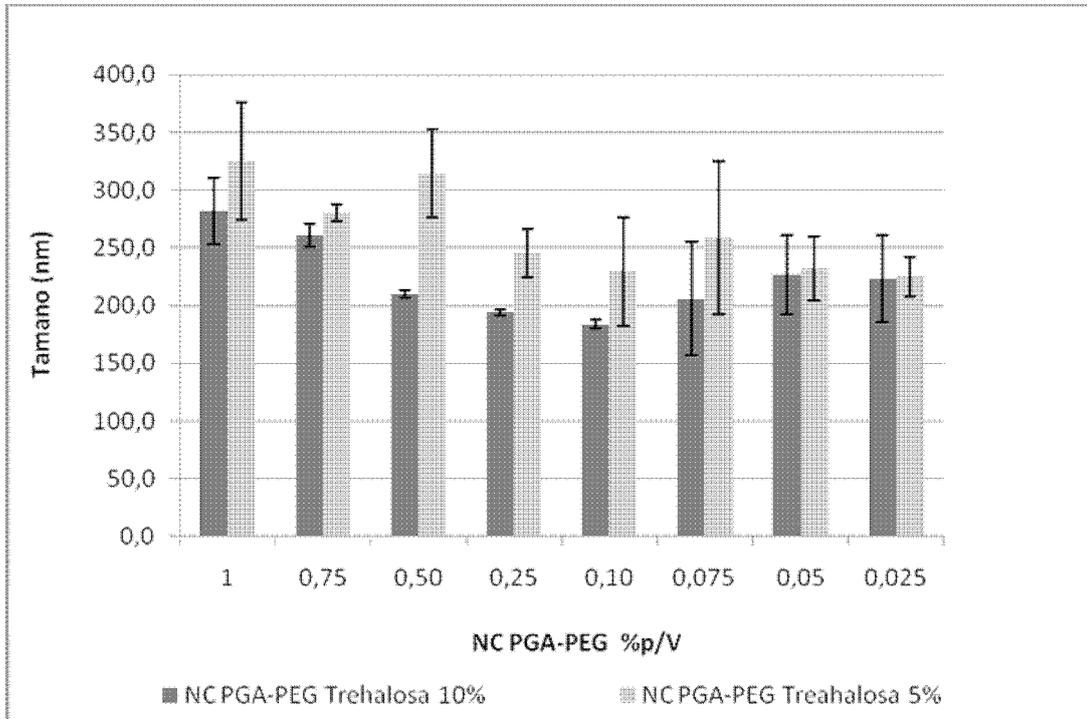


FIGURA 2b

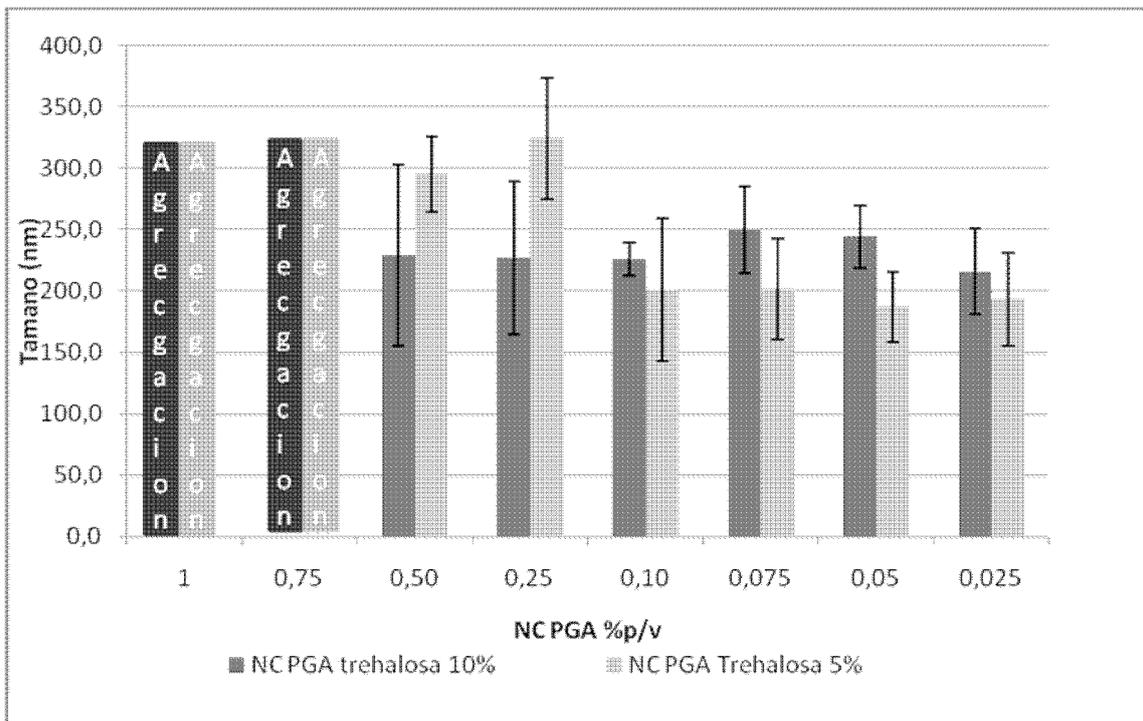


FIGURA 3

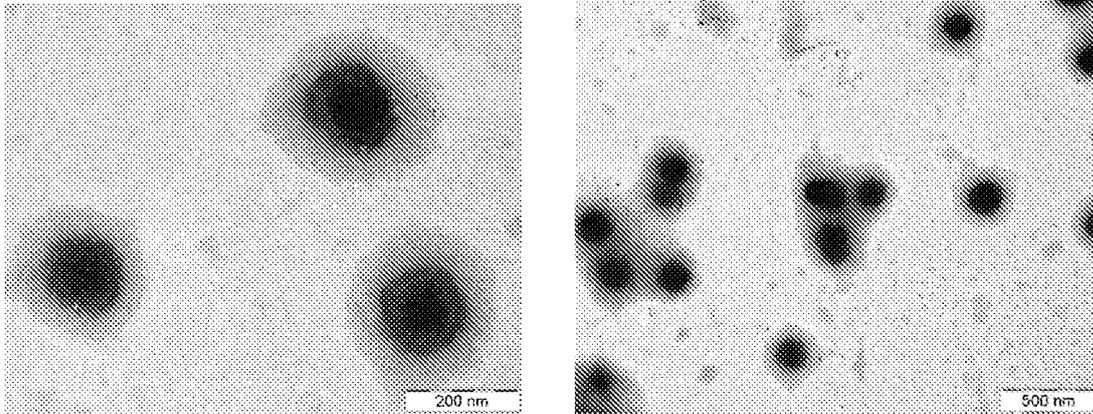


FIGURA 4

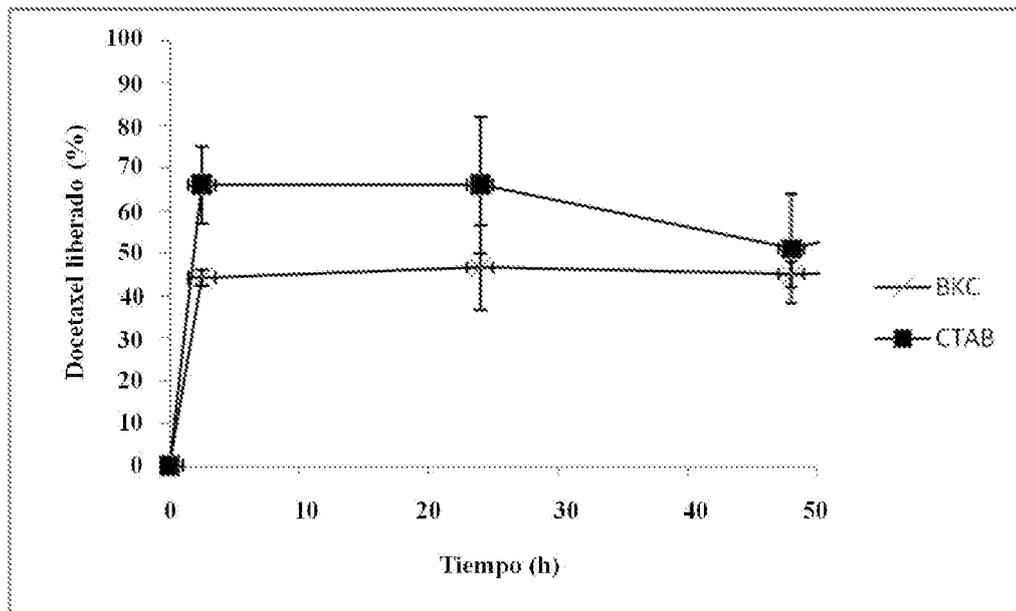


FIGURA 5a

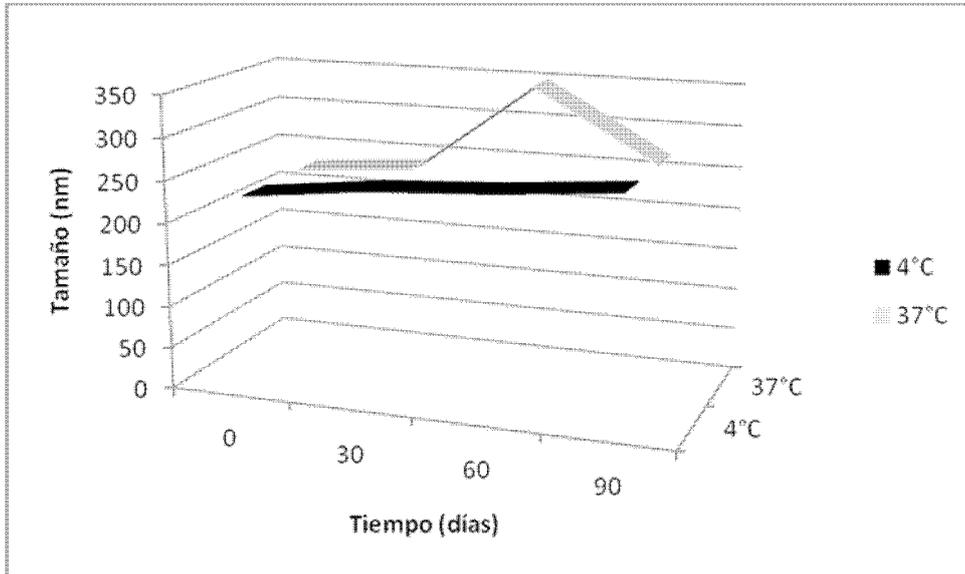


FIGURA 5b

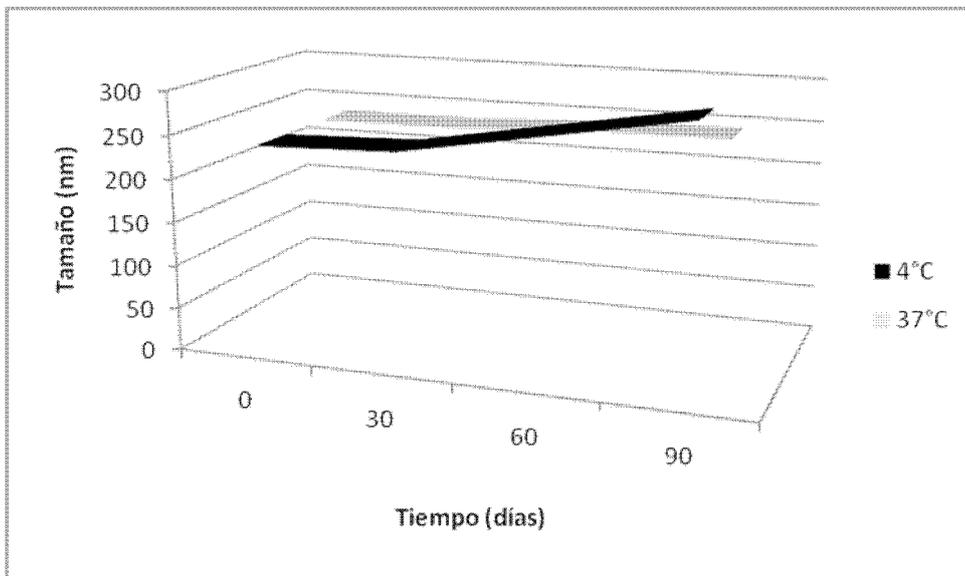


FIGURA 6

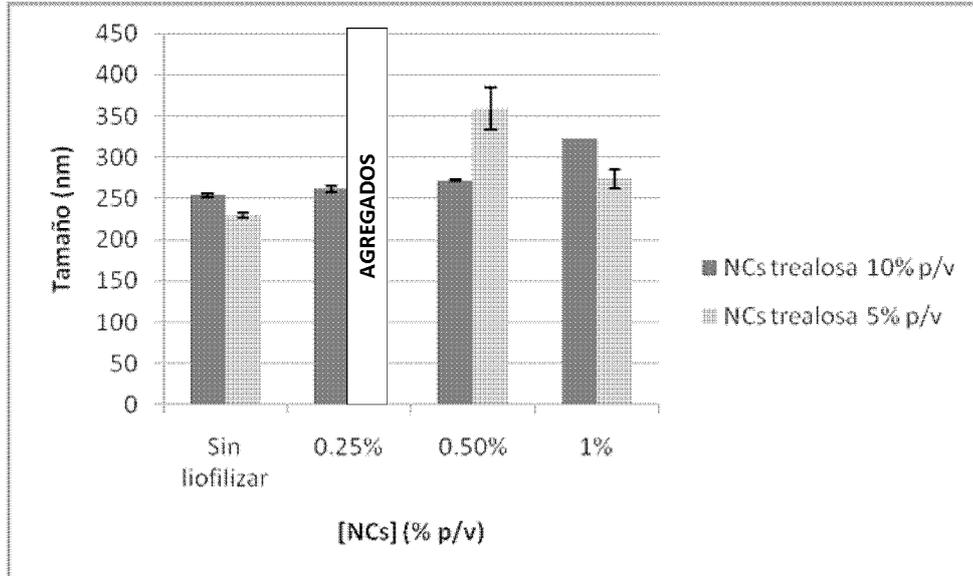


FIGURA 7a

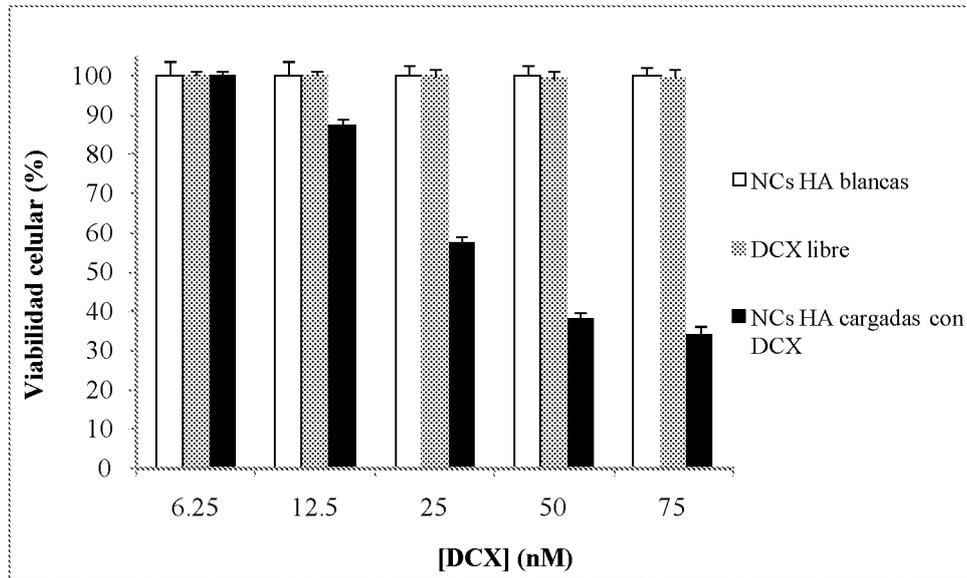


FIGURA 7b

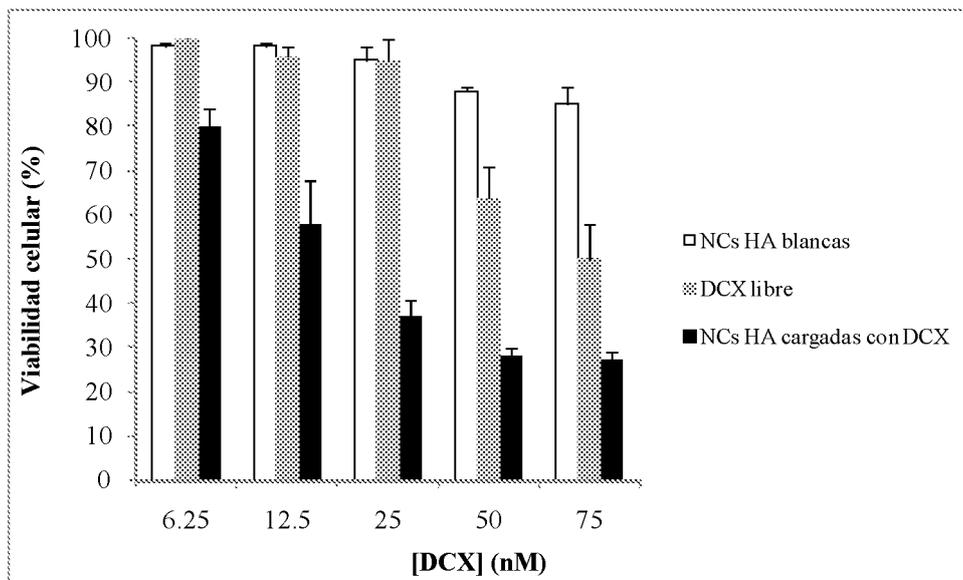


FIGURA 8a

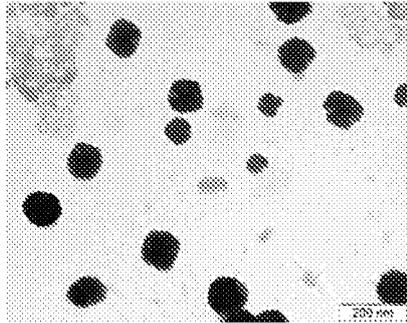


FIGURA 8b

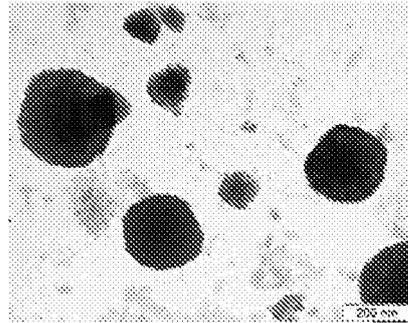


FIGURA 9

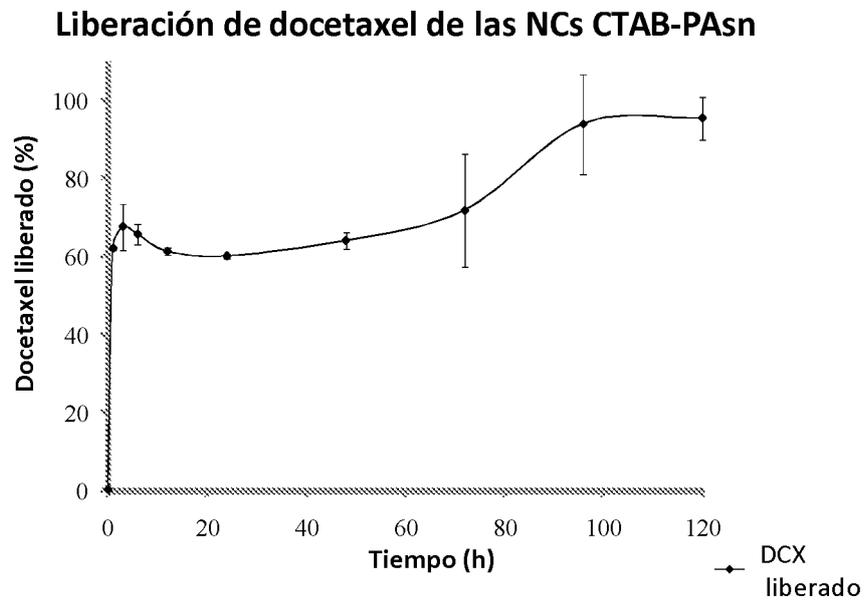


FIGURA 10a

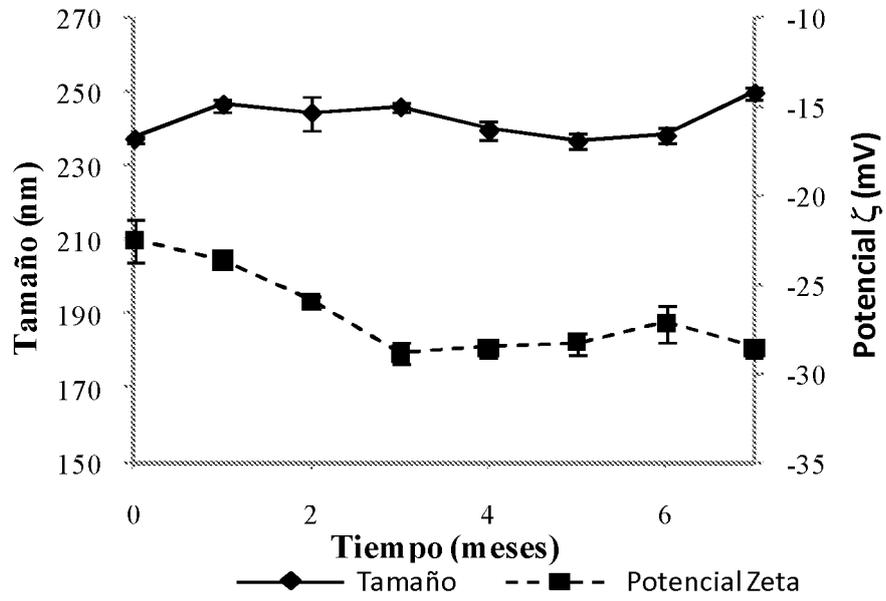
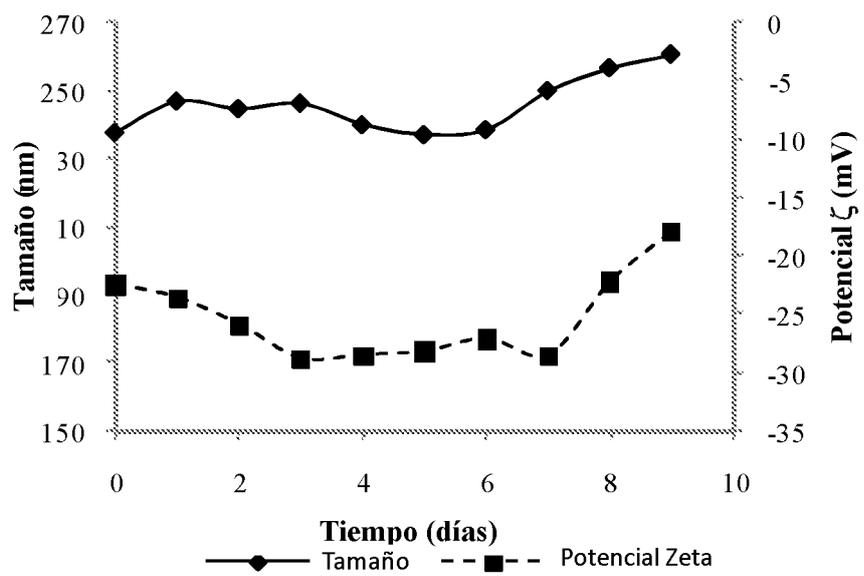


FIGURA 10b



FUGURA 10c

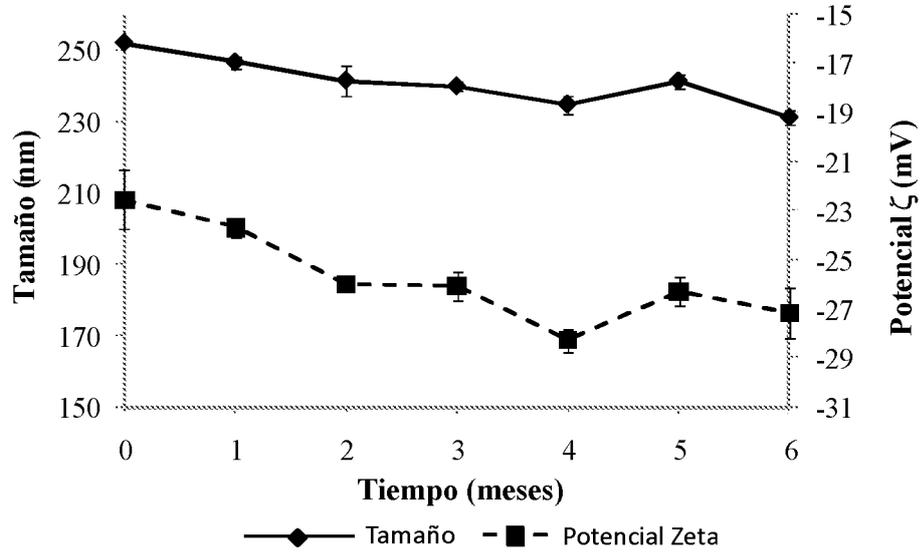


FIGURA 10d

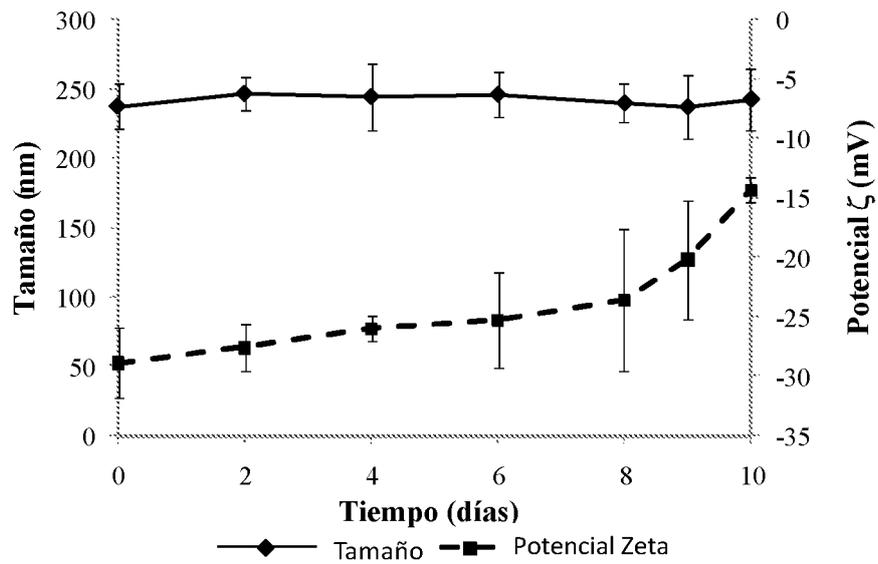


FIGURA 11a

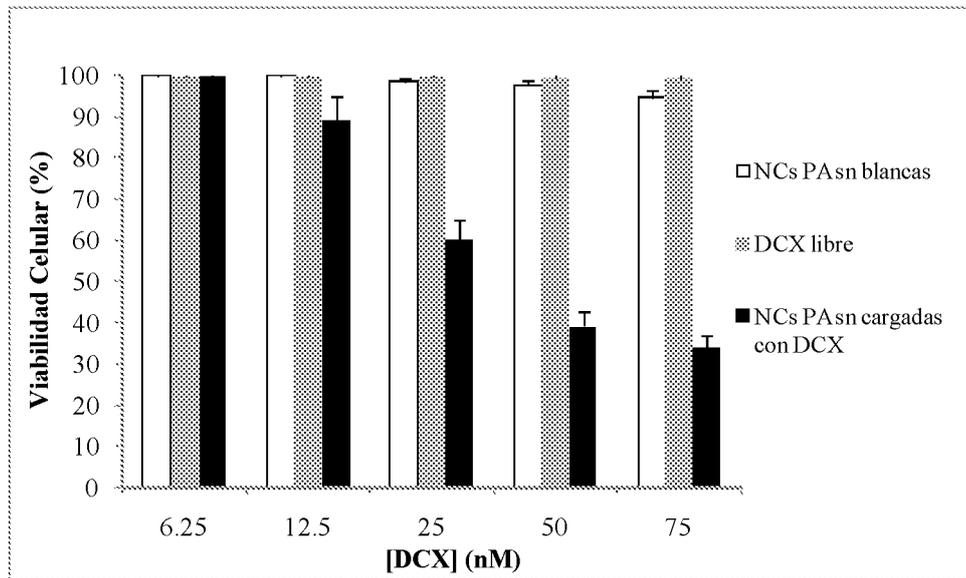
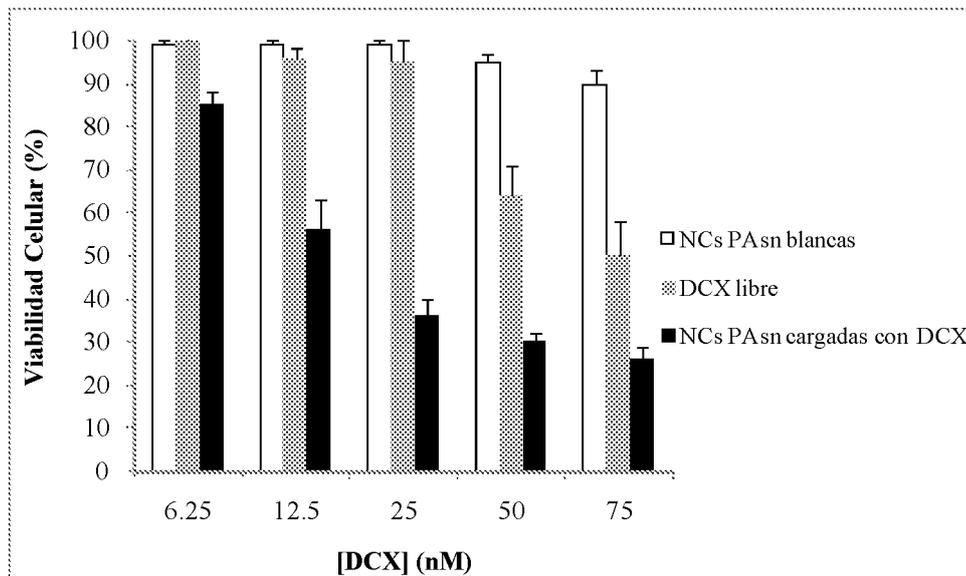


FIGURA 11b





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201130015

②² Fecha de presentación de la solicitud: 10.01.2011

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BR PI0803473 A2 (FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO, UNIVERSIDADE DE SAO PAULO) 15.06.2010, reivindicaciones y (resumen). [en línea][recuperado el 18.04.2012]. Recuperado de: EPOQUE WPI Database; DW 201156; nº acceso 2010-J15879[56].	1-26
A	WO 2009087678 A2 (SUN PHARMA ADVANCED RESEARCH COMPANY LIMITED) 16.07.2009, reivindicaciones.	1-26
A	YENICE, IREM et al.; Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea; Experimental Eye Research (2008) volumen 87, páginas 162-167; ISSN 0014-4835.	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.04.2012

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/51 (2006.01)

A61K47/34 (2006.01)

A61K47/36 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

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

A61K, B82Y

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

INVENES, EPODOC, CA, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BR PI0803473 A2 (FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO, UNIVERSIDADE DE SAO PAULO)	15.06.2010
D02	WO 2009087678 A2 (SUN PHARMA ADVANCED RESEARCH COMPANY LIMITED)	16.07.2009
D03	YENICE, IREM et al.; Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea; Experimental Eye Research (2008) volumen 87, páginas 162-167; ISSN 0014-4835.	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 que comprenden un aceite, un tensioactivo catiónico y un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglutámico, ácido poliglutámico-polietilenglicol, ácido hialurónico y poliasparagina o una combinación de los mismos, y opcionalmente un ingrediente activo, con la condición de que cuando dicho sistema de nanocápsulas incluye ácido poliglutámico o ácido poliglutámico-polietilenglicol, entonces el ingrediente activo no es una didemina o una tamarina. Se refiere asimismo al procedimiento de obtención de dicho sistema, a la composición farmacéutica que lo contiene y al uso del mismo en la preparación de un medicamento.

El documento D01 divulga un sistema de liberación de principios activos que consiste en nanopartículas que comprenden un aceite, un tensioactivo, una molécula biodegradable y una sustancia activa. Entre la relación de moléculas biodegradables figuran los polímeros biodegradables y entre ellos el ácido hialurónico. Las nanopartículas se preparan a partir de una solución del polímero biodegradable y el principio activo que se añade a una solución que es mezcla del aceite y el surfactante.

El documento D02 divulga una nanodispersión de nanopartículas que comprenden un derivado de taxano, un polímero y un tensioactivo.

El documento D03 divulga nanoesferas de poli(epsilon-caprolactona) recubiertas con ácido hialurónico como sistema de liberación de ciclosporina A en la córnea.

A la vista de los documentos citados, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1-26 de la solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).