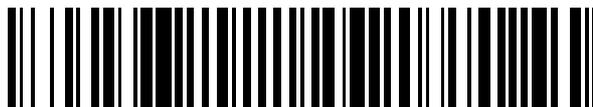


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 132**

21 Número de solicitud: 201101095

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61K 31/473 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.04.2013

Fecha de la concesión:

03.06.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

10.06.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
EDIFICIO EMPRENDIA- CAMPUS VIDA
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA (A Coruña)
ES y
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SOBARZO SANCHEZ, Eduardo;
CEBEY LOPEZ, Miriam;
FONTENLA, Jose Angel;
OTERO ESPINAR, Francisco;
TORRES LABANDEIRA, Juan J.;
GRILLO, Renato y
FERNANDEZ FRACETO, Leonardo**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **NANOCAPSULAS DE OXOISOAPORFINAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DEPRESION**

57 Resumen:

Nanocápsulas de oxoisoaporfinas para el tratamiento de la depresión. Se describen sistemas nanocapsulares que incorporan compuestos de fórmulas I ó II que permiten la liberación controlada en el tiempo de dichos compuestos. También se describen el procedimiento de obtención, las composiciones farmacéuticas y el uso para la preparación de un medicamento.

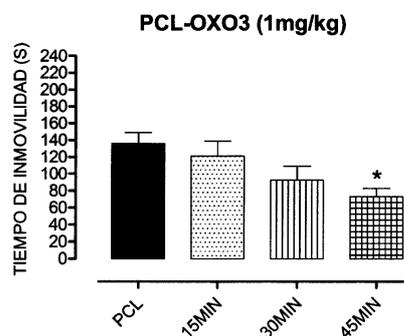


FIGURA 9

ES 2 402 132 B1

DESCRIPCIÓN

NANOCÁPSULAS DE OXOISOAPORFINAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN

Sector de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a nanocápsulas de compuestos de fórmula I o II y a composiciones farmacéuticas que comprenden esas nanocápsulas.

Antecedentes

10 Un grupo de compuestos derivados de oxoisoaporfinas de fórmula I y II, resultaron ser selectivos y potentes inhibidores de la monoamino oxidasa A (MAO-A) en rangos de valores de IC₅₀ de nM a pM en ensayos realizados *in vitro* (Eduardo Sobarzo-Sánchez, Matilde Yañez Jato, Francisco Orallo Cambeiro, Eugenio Uriarte Villares y Ernesto Cano Rubio, “*Use of oxoisoaporphines and their derivatives thereof as selective inhibitors of monoamino oxidase A*”, **2008**, WO/2009/034216).

15 Pero es necesario tener en cuenta que el SNC está protegido por la barrera hematoencefálica (BHE), un sistema de defensa homeostático diseñado para la protección contra patógenos y toxinas. La BHE es efectiva en prevenir la entrada de potenciales materiales dañinos regulando la entrada de solutos a través de las células endoteliales. Sin embargo, esto también limita la capacidad de acceso al SNC de compuestos
20 terapéuticamente beneficiosos. Aunque es ampliamente conocido que las moléculas pequeñas pueden atravesar la BHE, su capacidad de acceso está condicionado por el tamaño (< 400 Da) y por la lipofilidad.

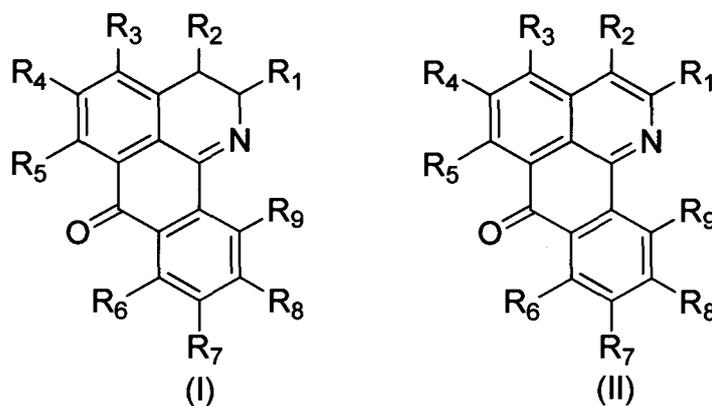
Es necesario diseñar una formulación que permita que estos compuestos atraviesen la barrera hematoencefálica para que su administración sea la más adecuada.

25

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado sistemas nanoparticulares estables, con elevada eficacia de asociación de los compuestos de fórmulas I y II, y que permiten liberarlos de forma controlada en el tiempo. Por lo que, la presente invención
30 aporta un sistema de nanocápsulas adecuado para incorporar los compuestos de fórmula I y II, que presenta potencialidad para atravesar la barrera hematoencefálica. De este modo la invención proporciona además composiciones farmacéuticas selectivas y eficaces para la inhibición de MAO-A, y útiles en el tratamiento de la depresión.

Así, en un aspecto la invención se dirige a un sistema de nanocápsulas caracterizadas por un tamaño medio inferior a 1 μm que comprende un polímero, un agente tensioactivo, un aceite y un compuesto seleccionado de entre los compuestos de fórmula I y II, sus sales, hidratos, solvatos y N-óxidos,



5

donde:

$-R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8,$ y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloheteroalquilo, arilo, $-OR^b$ y $-NR^aR^b$;

10 $-R^a$ y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo o, alquenilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, heteroarilo, o, R^a y R^b conjuntamente forman un anillo de heterociclo, de 4 a 7 miembros conteniendo 0-2 heteroátomos independientemente seleccionados entre oxígeno, azufre y $N-R^c$, donde R^c se selecciona entre hidrógeno, alquilo, y $-C(O)R^b$.

15 En otro aspecto la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende los sistemas de nanocápsulas descritos anteriormente.

En otro aspecto la invención se dirige al uso de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para la preparación de un medicamento. En una realización particular, el medicamento es para el tratamiento de desórdenes nerviosos.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de los sistemas de la invención como se definieron anteriormente, que comprende:

- a) preparar una fase orgánica que comprende un disolvente orgánico, un polímero, un aceite y un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por los compuestos de fórmula I y II, sus sales, hidratos, solvatos y N-óxidos,
- 25 b) preparar una fase acuosa que comprende al menos un agente tensioactivo,
- c) mezclar las fases preparadas en las etapas a) y b), y
- d) eliminar el disolvente.

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de las nanocápsulas poliméricas que contienen OXO compuestos: A: polímero; B: fase oleosa; C: nanocápsulas; D: oxoisoporfirinas; E: Fase acuosa; F: Interacción de los Oxo compuestos con la fase oleosa y la matriz de polímero.

Figura 2. Cromatograma de **OXO 1** obtenido bajo condiciones cromatográficas descritas.

Figura 3A. Curva de calibración para el compuesto OXO1 por CLAE. Ecuación de la recta: $y = 0,64x + 0,176$. **Figura 3B:** Curva de calibración para el compuesto oxoisoaporphines-2 por CLAE. Ecuación de la recta: $y = 4,37x - 0,43$; **Figura 3C:** Curva de calibración para el compuesto oxoisoaporphines-3 por CLAE. Ecuación de la recta: $y = 0,98x + 0,20$; **Figura 3D:** Curva de calibración para el compuesto oxoisoaporphines-4 por CLAE. Ecuación de la recta: $y = 3,99x + 2,44$; **Figura 3E:** Curva de calibración para el compuesto oxoisoaporphines-5 por CLAE. Ecuación de la recta: $y = 0,95x + 0,89$; **Figura 3F:** Curva de calibración para el compuesto oxoisoaporphines-6 por CLAE. Ecuación de la recta: $y = 0,87x - 3,64$.

Figura 4. Esquema del sistema con el que se captaba el comportamiento de los animales.

Figura 5. a) Vista de los vasos y ratones desde la posición de la cámara de vídeo y b) Representación del camino recorrido por los animales pinchados con vehículo (PCL) en el área correspondiente a los vasos.

Figura 6. Tiempo de inmovilidad de los ratones tratados con la molécula libre **OXO 4** a una dosis de 1mg/kg. n=8 para cada grupo. Los resultados se expresan en segundos como la media \pm error estándar. Los asteriscos marcan los resultados estadísticamente significativos de acuerdo con un tratamiento ANOVA seguido de un test de Dunnet. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 7. Tiempo de inmovilidad de los ratones tratados con la molécula **PCL-OXO 4** (molécula nanoencapsulada) a una dosis de 1mg/kg. n=8 para cada grupo. Los resultados se expresan en segundos como la media \pm error estándar. Los asteriscos marcan los resultados estadísticamente significativos de acuerdo con un tratamiento ANOVA seguido de un test de Dunnet. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 8. Tiempo de inmovilidad de los ratones tratados con la molécula libre **OXO 3** a una dosis de 1mg/kg. n=8 para cada grupo. Los resultados se expresan en segundos como la media \pm error estándar. Los asteriscos marcan los resultados estadísticamente

significativos de acuerdo con un tratamiento ANOVA seguido de un test de Dunnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 9. Tiempo de inmovilidad de los ratones tratados con la molécula **PCL-OXO 3** (molécula nanoencapsulada) a una dosis de 1mg/kg. $n=8$ para cada grupo. Los resultados se expresan en segundos como la media \pm error estándar. Los asteriscos marcan los resultados estadísticamente significativos de acuerdo con un tratamiento ANOVA seguido de un test de Dunnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Descripción detallada de la invención

- 10 Los compuestos de fórmulas I y II ya mostraron una elevada selectividad en la inhibición de MAO-A frente a MAO-B y una actividad superior en comparación a principios activos como, por ejemplo, Clorgilina y Moclobemida (WO2009034216, tabla 1 página 23). Estas ventajas los hacen excelentes candidatos en el tratamiento de desórdenes nerviosos como desórdenes bipolares, depresivos, pánico, etc.
- 15 Los compuestos de fórmulas I y II pueden estar en forma de sales, como por ejemplo, la sal de amonio. Los compuestos I y II también pueden estar en forma oxidada, en cuyo caso son N-óxidos.

- En una realización particular, en los compuestos de fórmula I, R^1 y R^2 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, halógeno, ciano, alquilo, alquenilo, $-OR^b$ y $-NR^aR^b$; y
- 20 R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloheteroalquilo, arilo, $-OR^b$ y $-NR^aR^b$;
- 25 donde R^a y R^b son como se definieron anteriormente.

- En otra realización particular, en los compuestos de fórmula I, R^1 y R^2 son hidrógeno y R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, halógeno, y $-OR^{b1}$; donde R^{b1} se selecciona entre hidrógeno y alquilo.
- 30

En otra realización particular, en los compuestos de fórmula I, R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 son hidrógeno y R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, metilo o hidroxilo.

En una realización particular, en los compuestos de fórmula II, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, halógeno, nitro, alquilo, cicloalquilo, arilo o $-OR^b$; donde R^b es como se definió anteriormente.

5

En otra realización particular, en los compuestos de fórmula II, R^1 y R^2 se seleccionan entre hidrógeno y halógeno, y R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, halógeno, nitro, y $-OR^{b1}$; donde R^{b1} se selecciona entre hidrógeno y alquilo.

10

En una realización particular, los compuestos de fórmula I y II se seleccionan preferentemente entre los compuestos:

1. 2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
2. 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
- 15 3. 5-metoxi-2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
4. 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
5. 5-metoxi-6-hidroxi-2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
6. 5-metoxi-6-hidroxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

20 En la presente invención se entiende por “alquilo” una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que no contiene ninguna instauración, de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-NR^a S(O)_m R^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-SR^b$, $-S(O)_m R^b$, $-S(O)_m NR^a R^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-NR^a R^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^a R^b$, $-NR^a C(O)R^b$, $-NR^a C(O)OR^b$, $-NR^a C(O)NR^a R^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

“Cicloalquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica que no contiene ninguna instauración, de 3 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 5 a 6 átomos de carbono.

30 El cicloalquilo puede ser monocíclico, bicíclico o tricíclico y puede incluir anillos fusionados. Opcionalmente el cicloalquilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre halógeno, ciano, $-OR^b$, $-NR^a S(O)_m R^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-SR^b$, $-S(O)_m R^b$, $-S(O)_m NR^a R^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-NR^a R^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^a R^b$, $-NR^a C(O)R^b$, $-NR^a C(O)OR^b$, -

$\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, alquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

5 “Alquenilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que contiene al menos una insaturación, de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre halógeno, ciano, $-\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{SR}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{NR}^a\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{CO}_2\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

10 “Cicloheteroalquilo” se refiere a un cicloalquilo que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre oxígeno, nitrógeno o azufre, por ejemplo: pirrolidinilo, morfolinilo, piperazinilo y piperidinilo. Opcionalmente el cicloheteroalquilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{SR}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{NR}^a\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{CO}_2\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, alquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

20 “Arilo” se refiere a un hidrocarburo aromático de 6 a 10 átomos de carbono, por ejemplo: fenilo o naftilo; opcionalmente el arilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{SR}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{NR}^a\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{CO}_2\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

25 “Heteroarilo” se refiere a un arilo que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre oxígeno, nitrógeno o azufre, por ejemplo: piridilo, pirazolilo, triazolilo, pirimidilo, isoxazolilo, indolilo y tiazolilo; opcionalmente el heteroarilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{SR}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{R}^b$, $-\text{S}(\text{O})_m\text{NR}^a\text{R}^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{CO}_2\text{R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^b$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

Los compuestos de fórmula I y II se preparan según las referencias publicadas con anterioridad (Eduardo Sobarzo-Sánchez, Bruce K. Cassels, Carolina Jullian and Luis Castedo *Magn. Reson. Chem.* (2003) 41, 296–300; Eduardo Sobarzo-Sánchez, Julio De la Fuente and Luis Castedo *Magn. Reson. Chem.* (2005) 43, 1080–1083).

5

Los sistemas de nanocápsulas de la presente invención se caracterizan porque el tamaño medio de las partículas que lo forman es inferior a 1 micrómetro.

Por el término “tamaño medio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanocápsulas, que comprende el sistema. El tamaño medio de estos sistemas puede
10 medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen en la parte experimental.

Las nanocápsulas del sistema de la invención tienen un tamaño de partícula medio inferior a 1 micrómetro, es decir, tienen un tamaño promedio de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 100 y 500 nm, incluso más preferiblemente de entre 150 y 300
15 nm. El tamaño medio de las partículas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación de las mismas.

Por otra parte, las nanocápsulas presentan una carga eléctrica negativa (medida mediante el potencial Z). En una realización particular de la invención, las nanocápsulas presentan carga negativa que puede variar entre -10 mV y -60 mV. En otra realización
20 particular, la carga negativa está comprendida entre -20 y -45 mV.

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

El índice de polidispersión del sistema de las nanocápsulas de la invención es bajo. En
25 una realización particular, el índice de polidispersión del sistema de nanocápsulas de la invención está comprendido entre 0.001 y 0.7. En una realización particular, el índice de polidispersión de los sistemas de la invención está comprendido entre 0.01 y 0.2.

En una realización particular, el polímero que constituye las nanocápsulas de la invención se selecciona de entre poliestireno, poliéster, polifosfazina, polietilenglicol,
30 polivinil alcohol, poliacrilamida, poliacrilato, polivinil pirrolidinona, polialilamina, polietileno, ácido poloacrílico, polimetacrilato, polisiloxano, polioxietileno, celulosa, quitosano, poli-hidroxitarato y sus derivados.

En una realización particular, el poliéster se selecciona de entre el grupo consistente en policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, copolímero ácido glicólico y ácido láctico, ácido polihidroxibutírico, ácido polihidroxivalérico, policianoacrilato y poli-metiliden-malonato.

- 5 En una realización más particular, el poliéster se selecciona de entre el grupo consistente en ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli-epsilon-caprolactona. De forma preferida, el polímero es poli-epsilon-caprolactona.

En una realización particular, el aceite se selecciona entre un aceite mineral, sintético o vegetal. En una realización particular, el aceite se selecciona de entre hidrocarburos
10 alifáticos saturados y no saturados, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos cíclicos y acíclicos, triglicéridos de cadena carbonada C1-C24 saturados o no saturados. En una realización más particular, triglicéridos de cadena carbonada C1-C6. En otra realización particular, triglicéridos de cadena carbonada C8-C20. En una realización particular, el aceite se selecciona de entre aceite de girasol, oliva, soja, palma y colza. En una
15 realización particular, el aceite es un triglicérido de ácido cáprico y caprílico (Miglyol 810).

Se entiende como “agente tensioactivo” cualquier molécula compuesta de una parte hidrófoba y un resto hidrófilo. Estas moléculas presentan, por tanto, propiedades
20 anfífilas, lo que hace que en una mezcla agua/aceite, éstas migren hacia la superficie entre el agua y la fase oleosa. Así, la cabeza hidrofílica se mantiene en la fase acuosa y la cola hidrófoba interacciona con el aceite alterando las propiedades superficiales de la interfaz agua/aceite y permitiendo la formación de una emulsión, así como su estabilización.

25 En una realización particular, el agente tensioactivo se selecciona entre etoxilato de aceite de castor, Pluronic F68 (copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno), BRIJ (estearato), Tween 20 (polisorbato 20), Tween 40 (polisorbato 40), Tween 60 (polisorbato 60), Tween 80 (polisorbato 80), Lauril sulfato sódico, Crillet 1, Crillet 4 HP, Crillet 4 NF, Cremophor RH40, Cremophor RH60, Cremophor EL, Etocas 30,
30 Mkkol HCO-60, Labrasol, Acconon MC-8, Gelucire 50/13, Gelucire 44/14, MYRJ, polioxameros, Epikuron 170, fosfolípidos, Span (monoestearato de sorbitan), glicerol monoestearato, Capmul MCM (caprílico/caprico glicérido), Capmul MCM 8, Capmul MCM 10, Imwitor 988, Imwitor 742, Imwitor 308, Labrafil M 1944 CS, Labrafil M 2125, Capryol PGMC, Capryol 90, Lauroglycol, Captex 200, ácido graso etoxilado,

Plurol oleico (poligliceril-6-dioleato), Crill 1 (laurato de sorbitan), Crill 4 (oleato de sorbitan), Maisine (monolinoleato de glicerina), Peceol (gliceril oleato) y Arlacel P135 (polietilenglicol dipolihidroxiestearato). En una realización particular, el fosfolípido es lecitina.

5

El procedimiento descrito en la presente invención permite obtener los sistemas de la invención de forma sencilla, en condiciones de trabajo suaves de manera que se evita la degradación de los principios activos que comprenden.

En una realización particular, el procedimiento para la preparación de los sistemas de la invención como se describieron anteriormente, comprende:

10

- e) preparar una fase orgánica que comprende un disolvente orgánico, poli-epsilon-caprolactona y un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por los compuestos de fórmula I y II, sus sales, hidratos, solvatos y N-óxidos,
- f) preparar una fase acuosa que comprende al menos un agente tensioactivo,
- g) mezclar las fases preparadas en las etapas a) y b), y
- h) eliminar el disolvente.

15

En una realización particular, el disolvente se selecciona de entre acetona, etanol, agua, cloroformo, metanol, acetato de etilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y tetrahidrofurano.

20

En una realización particular, la fase orgánica comprende además un agente tensioactivo soluble en aceite. Los agentes tensioactivos solubles en aceite son conocidos por el experto en la materia, y son por ejemplo, lecitina, polisorbato 80, etc.

25

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

1.1 Material

La Poli-ε-caprolactona (PCL, 80.000 MW) fue adquirida de Sigma (Aldrich Chem. Co.), monoestearato de sorbitán (Span 60[®]) (Sigma Aldrich Chem. Co.), Polisorbato 80 (Tween 80[®]) (LabSynth, Brasil), triglicéridos de ácidos caprílico/cáprico (Miglyol 810[®]) (Hüls, Alemania) y acetona de grado analítica (LabSynth, Brasil). Los solventes empleados en análisis de cromatografía eran de grado HPLC, acetonitrilo (JT Baker[®]) y

30

agua desionizada (Milli-Q, Millipore). Las soluciones fueron filtradas usando Millipore (Belford, EE. UU), membranas de nilón de 0.22 μm (Belford, EE. UU).

1.2 Métodos

5 1.2.1 Preparación de cápsulas poliméricas conteniendo derivados de oxoisoaporfinas

Las nanocápsulas de Poli- ϵ -caprolactona (PCL-NC) vacías y cargadas con oxoisoaporfinas (OXO) (Figura 1) fueron preparadas por deposición interfacial (Fessi, H.; Puiseix, F.; Devissaguet, J. P.; 1988, Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent*, 0274961 A1). Seis tipos de oxoisoaporfinas fueron asociadas con nanocápsulas.

El método consiste en mezclar una fase aceitosa en una fase acuosa. La fase orgánica se preparó empleando 100 mg de polímero (PCL), 30 ml de disolvente orgánico (acetona), 200 mg de triglicéridos de ácido cáprico y caprílico (Miglyol 810), 40 mg
15 monoestearato de sorbitán (Span 60) y 7 mg de OXO. La fase acuosa se preparó empleando 30 ml de solución acuosa que contiene 60 mg de polisorbato 80 (Tween 80). Después de la disolución de los componentes de ambas fases, la fase orgánica se introdujo poco a poco con la ayuda de un embudo, en la fase acuosa con agitación magnética. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación durante 10 minutos y
20 después el disolvente orgánico se eliminó utilizando un evaporador rotatorio hasta que el volumen final de 10 ml (0,70% del Compuesto). Todas las preparaciones fueron realizadas protegidas de la luz y conservadas en la oscuridad todo el tiempo.

1.2.2 Condiciones cromatográficas para la cuantificación de oxoisoaporfinas

25 Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron desarrollados usando un instrumento Varian[®] ProStar, equipado con una bomba PS 210, detector PS 325 UV-VIS, horno Metatherm[®], columna Phenomenex[®] y un inyector automático. Los cromatogramas fueron procesados usando el software Galaxy Workstation[®]. La Tabla 1 muestra las condiciones cromatográficas de los OXO compuestos, y las muestras y la
30 fase móvil fueron previamente filtradas a través de membranas de nylon Millipore[®] de 0.22 μm .

Tabla 1. Condiciones cromatográficas de los **OXO** compuestos.

	OXO 1, 2, 3, 4	OXO 5	OXO 6
Fase móvil	Acetonitrilo/agua (50:50, v/v)	Acetonitrilo/agua (50:50, v/v)	Metanol/agua (60:40, v/v)
Volumen de inyección	20 µL	20 µL	20 µL
Velocidad de flujo Fase móvil	2 mL/min	2 mL/min	1 mL/min
Longitud de onda (λ)	370 nm, 410 nm, 370 nm	385 nm	241 nm
Columna cromatográfica	Phenomenex Gemini 5µ C ₁₈ 110A, 150 mm x 4.60 mm	Phenomenex Gemini 5µ C ₁₈ 110A, 250 mm x 4.60 mm	Phenomenex Gemini 5µ C ₁₈ 110A, 250 mm x 4.60 mm
Temperatura de la columna	Ambiente	Ambiente	Ambiente

1.2.3 Medidas de eficiencia de asociación

Las cantidades totales (100%) de los **OXO** compuestos presentes en en las suspensiones de nanocápsula (NC) fueron determinadas por HPLC, después de la dilución en acetonitrilo y filtración a través de una membrana Millipore de por 0.22 µm.

Las cantidades de compuesto asociado con la NC fueron medidas usando el método ultrafiltración/centrifugación, el cual consiste en centrifugar la suspensión de NC por 10 min. en recipientes de ultrafiltración formados de celulosa regenerada de 30 kDa (Microcon, Millipore), y luego analizando los ultrafiltrados por HPLC. Sólo el compuesto libre pasó por la membrana de 30 kDa, de modo que las cantidades asociadas con el nanopartícula pudieran ser estimadas por diferencia (Gamisans, F.; Lacoulonche, F.; Chauvet, A.; Espina, M.; Garcia, M. L.; Egea, M. A. *Int. J. Pharm.* **1999**, *179*, 37-48.; Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova*, **2003**, *26*, 726-737.; Kilic, A. C.; Capan, Y.; Vural, I.; Gursoy, R. N.; Dalkara, T.; Cuine, A.; Hincal, A. A. *J. Microencapsulation* **2005**, *22*, 633-641).

1.2.4 Caracterización de las nanocápsulas de Poli-ε-caprolactona (PCL)

1.2.4.1 Medidas de tamaño y polidispersión

La técnica de dispersión de luz fue usada para determinar el tamaño promedio y la distribución de las nanopartículas. Este análisis fue llevado a cabo después de la dilución (1/100 v/v) de las suspensiones de nanopartículas, usando un analizador de partículas Malvern® Zetasizer HSA 3000 (United Kingdom) en un ángulo fijo de 90° y temperatura de 25°C, inmediatamente después de la preparación. Cada resultado fue expresado como la medida de tres ensayos (Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S. *J. Control. Release* **1999**, *57*, 171–185. ; Venkatraman, S. S.; Jie, P.; Min, F.; Freddy, B. Y. C.; Leong-Huat, G., *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 219–232).

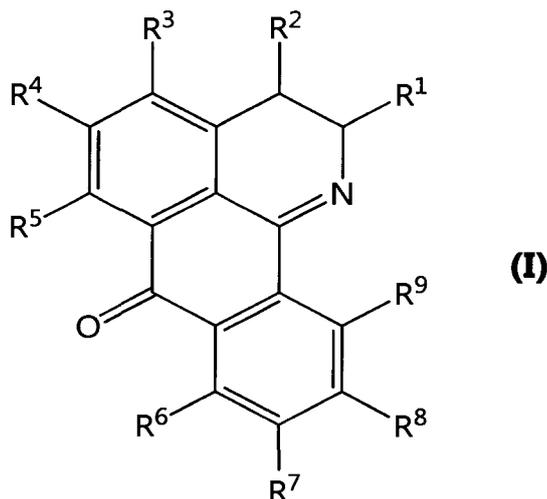
1.2.4.2 Potencial zeta

Las cargas superficiales de las nanopartículas fueron valoradas por la determinación del potencial zeta, usando el instrumento Zetasizer HSA 3000, inmediatamente después de la preparación. Los análisis fueron realizados después de la dilución (como fue mencionado anteriormente) y los resultados fueron los promedios de tres medidas.

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS

Los compuestos evaluados en la presente invención están basados en las siguientes fórmulas generales, correspondiente a la fórmula general (I):

A. 2,3-DIHIDRO-7H-DIBENZO[de,h]QUINOLIN-7-ONA (2,3-DIHIDRO-OXOISOAPORFINA), Fórmula general (I):



25 En que:

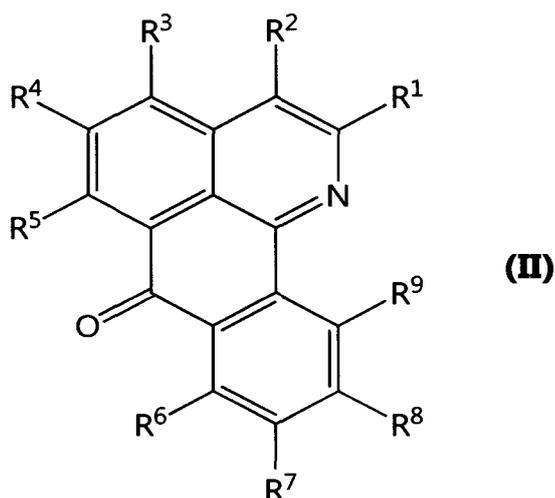
a) en que si: - R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 es hidrógeno, se trata de 2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante **OXO 1**;

b) en que si: - R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 es hidrógeno y R^4 representa un metoxilo, se trata de 5-metoxi-2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado

5 de aquí en adelante **OXO 3**; y

c) en que si:- R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 es hidrógeno, R^4 representa un metoxilo y R^5 representa un hidroxilo; se trata de 5-metoxi-6-hidroxi-2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante **OXO 5**.

10 **B.** 7H-DIBENZO[de,h]QUINOLIN-7-ONA (**OXOISOAPORFINA**), Fórmula general (II):



En que:

a) en que si: - R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 es hidrógeno, se trata de 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante **OXO 2**;

b) en que si: - R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 es hidrógeno y R^4 representa un metoxilo, se trata de 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante **OXO 4**; y

c) en que si:- R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 es hidrógeno, R^4 representa un metoxilo y R^5 representa un hidroxilo; se trata de 5-metoxi-6-hidroxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante **OXO 6**;

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

25 2.1 Análisis cromatográfico de las nanopartículas

Se realizó un análisis cromatográfico de todas las oxoisoaporfinas mencionadas en la presente invención. La Figura 2 muestra el cromatograma de **OXO 1**. Este compuesto muestra un buen perfil, con un pico simétrico y con un tiempo de retención de 5,3 min.

2.2 Curva analítica determinada por HPLC

5 La curva de calibración fue evaluada para todos los compuestos **OXO** (Figura 3). Los datos de las curvas estándar fueron obtenidos por triplicado y mostraron un comportamiento lineal con un buen coeficiente de correlación.

2.3 Eficiencia de asociación de los compuestos OXO en las nanopartículas

La determinación de la cantidades de compuestos asociados con las nanopartículas es especialmente compleja debido al pequeño tamaño de éstas últimas, lo cual complica la separación de las fracciones de compuesto libre y asociado (Magenheim, B.; Benita, S. T. P. *Pharma Sci.* **1991**, *1*, 221–241.; Soppimath, K. S.; Kulkarni, A. R.; Aminabhavi, T. M. *J Control Release* **2001**, *75*, 331–345). Además, otros factores influyen en la asociación, tales como las características físico-químicas del compuesto (Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J. –Ph.; Puisieux, F. *Int. J. Pharm.* **1995**, *113*, 57–63.; Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530–536), el pH del medio (Brasseur, N.; Brault, D.; Couvreur, P. *Int. J. Pharm.* **1991**, *70*, 129–135.; Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S. *J. Control. Release* **1999**, *57*, 171–185), las características de la superficie de la partícula o la naturaleza del polímero (Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M. J. *J Control Release* **2002**, *78*, 15–24), así como la cantidad de fármaco añadido a la formulación (Brasseur, N.; Brault, D.; Couvreur, P. *Int. J. Pharm.* **1991**, *70*, 129–135), el orden de adición y el tipo de surfactante usado para estabilizar la superficie polimérica (Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726–737).

25 La velocidad de asociación de **OXO** con las nanocápsulas de PCL fue determinado por el método de ultrafiltración/centrifugación usando HPLC. El grado de asociación de **OXO** fue determinado como la diferencia entre su concentración en el filtrado y la concentración total (100%). Los valores de asociación son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de eficiencia de asociación de los **OXO** compuestos con PCL-NC.

Muestras	Eficiencia de Asociación (%)
NC + OXO 1	99.60 ± 0.07

NC + OXO 2	95.10 ± 0.39
NC + OXO 3	99.51 ± 0.22
NC + OXO 4	96.26 ± 0.11
NC + OXO 5	99.59 ± 0.09
NC + OXO 6	99.50 ± 0.12

La eficiencia de asociación de los compuestos **OXO** en las nanocápsulas formadas por PCL fue muy elevado con valores cercanos al 100%, mostrando que existe una buena afinidad entre el fármaco y el polímero (Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 385, 113–142).

2.4 Caracterización de las nanocápsulas

La técnica correlación fotónica fue usada para determinar el tamaño promedio de las partículas (como el diámetro hidrodinámico) y el índice de polidispersión. Los valores de potencial zeta (mV) fueron determinados usando un analizador Zetasizer ZS90 (Malvern®). Los valores de tamaño, polidispersión y potencial zeta son mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de tamaño, polidispersión y potencial zeta de NC + OXO

Muestras	Tamaño de partícula (nm)	Polidispersión	Potencial zeta (mV)
NC	267.8 ± 0.40	0.126 ± 0.026	-37.4 ± 0.55
NC + OXO 1	244.2 ± 4.31	0.106 ± 0.008	-36.6 ± 0,51
NC + OXO 2	271.9 ± 4.79	0.130 ± 0.017	-39.2 ± 0.40
NC + OXO 3	247.2 ± 1.63	0.132 ± 0.019	-39.9 ± 0.25
NC + OXO 4	245.5 ± 1.30	0.104 ± 0.014	-39.3 ± 1.16
NC + OXO 5	273.9 ± 1.76	0.140 ± 0.015	- 37.4 ± 1.05
NC + OXO 6	249.8 ± 6.89	0.160 ± 0.043	-35.0 ± 0.80

Las nanopartículas presentaron una distribución de tamaño en la rango de 244-274 nm, indicando que había pequeñas diferencias en tamaño entre las formulaciones.

El índice de polidispersidad, que proporciona una indicación de la distribución de tamaño de las partículas, también puede ser usado para valorar la estabilidad. Los factores que influyen en la polidispersidad incluyen propiedades de la solución, la termodinámica del sistema y el método de preparación. Los valores de índice de polidispersidad altos son indicativos de la heterogeneidad en los diámetros de las partículas suspendidas, mientras los cambios con el tiempo son debido a la formación de poblaciones de partícula que tienen diámetros diferentes de aquellos partículas iniciales, debido a procesos de agregación, desintegración o degradación. Un valor de índice de polidispersidad más pequeño que 0.2 se considera ideal, ya que esto refleja un rango de tamaño de partícula estrecha (Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova*, **2003**, *26*, 726–737). En nuestro caso, los valores de polidispersidad obtenidos están todos por debajo de 0.2 (Tabla 3), indicando una homogeneidad de partícula excelente.

Otro parámetro considerado era la medida del potencial zeta. Un análisis del potencial zeta de las partículas refleja sus cargas superficiales. Este parámetro puede ser influenciado por la composición de partícula, medio de dispersión, pH, y la fuerza iónica del medio. Las nanopartículas mostrando valores (aproximadamente ± 30) son más estables en suspensión (Mohanraj, V. J.; Chen, Y. *Tropical J. Pharm. Res.* **2006**, *5*, 561–573). En todas las formulaciones preparadas el valor potencial zeta era negativo (Tabla 3). Para las formulaciones preparadas, los valores potenciales zeta medidos fueron bastante altos (> 35 mV), indicando que estas partículas probablemente tienen una buena estabilidad en solución.

Así, de acuerdo con los datos experimentales de síntesis y caracterización de las nanocápsulas de PCL conteniendo los derivados de oxoisoaporfina, estos sistemas supramoleculares mostraron una eficiencia de asociación excelente con el valor más alto ($> 99\%$). Las nanocápsulas mostraron un tamaño de partícula media de 260 nm, índices de polidispersidad < 0.2 y potenciales zeta cerca de -40 mV. La excelente interacción obtenida entre las nanocápsulas de PCL y los principios activos, juntos con una buena estabilidad de suspensión, abre nuevas perspectivas para la liberación controlada de estos compuestos.

3. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA IN VIVO DE

LAS OXOISOAPORFINAS LIBRE Y ENCAPSULADAS

Condiciones generales

- 5 Para realizar los ensayos *in vivo* se empleó un procedimiento experimental usado en la investigación preclínica de la depresión: el Test de Natación Forzada (Forced Swim Test, FST) también conocido como test de Porsolt. Este procedimiento es el más ampliamente aceptado y el más frecuentemente utilizado. Es un test validado para evaluar la potencial actividad antidepresiva *in vivo* de nuevas moléculas en animales de experimentación.
- 10 Las condiciones ambientales se han mantenido homogéneas y se han utilizado animales del mismo sexo y con pesos similares.
1. Los ensayos se realizaron en una habitación aislada acústicamente, con regulación automática de temperatura (19-21°C) y de la luz ambiental (encendida entre las 8:00 – 20:00, manteniendo períodos luz-oscuridad de 12 horas). Además, se realizó
15 un control de la humedad ambiental (45-60%).
 2. Se han utilizado ratones albinos macho Swiss de origen Charles River CD1, con un peso comprendido entre 20-35 g, que fueron suministrados por el animalario de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).
 3. Los animales se dispusieron en cajas de polipropileno (215x465x145 mm). El
20 suelo de la caja se mantuvo recubierto con un lecho de virutas de madera (Lignocel®, J. Rettenmaier & Söhne; Rosenberg, Alemania) que se cambiaban periódicamente. La alimentación de los animales se realizó con pellets comerciales de la marca SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) y al igual que el agua se le suministró a demanda.
 - 25 4. Los animales se mantuvieron un mínimo de 3 días en las condiciones descritas anteriormente antes de la realización de los ensayos farmacológicos. Dichos ensayos se realizaron durante el período de luz comprendido entre las 8:00-20:00.
 5. Tanto la estabulación como la manipulación y experimentación se han realizado de acuerdo con los patrones establecidos en la directiva del Consejo de las
30 Comunidades Europeas (86/609) y la legislación Española (RD 1201/2005 de 10 de octubre, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252, de 21 de octubre de 2005)).

Métodos y fármacos

El método *in vivo* realizado tiene como características principales que:

- Es un test corto en el tiempo (6 minutos)
- Detecta un amplio espectro de antidepresivos, independientemente de su mecanismo.
- Automatizado, por lo que es objetivo.

El comportamiento de los animales fue registrado durante 6 min mediante una cámara de vídeo analógica (Sony DXC-107A, Sony Corporation, Japón), posicionada en el techo de la habitación y perpendicular a los vasos con agua en los que se introdujeron los animales. La cámara está conectada a un adaptador (Sony CMA-D2) el cual envía la señal a un monitor (Sony PVM-14M2E) y a dos convertidores digitales:

- Una tarjeta digitalizadora Pico (Euresys, Liege, Bélgica), colocada en una de las ranuras PCI del ordenador (Dell Dimension 8200).
- Una tarjeta digitalizadora externa DVC-USB (Dazzle), (Figura 4).

La señal digitalizada por la tarjeta Pico es utilizada por el software de análisis del comportamiento (Computerized Animal Observation System –Ethovision V. 3.1.16, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda), instalado en el ordenador que se encontraba en una habitación adyacente.

El software EthoVision localiza el centro de gravedad del animal, simbolizado gráficamente por la intersección entre los ejes de coordenadas (x,y), almacena los datos y permitía el análisis posterior de múltiples parámetros (distancia recorrida, velocidad, etc.).

Todos los ensayos también fueron digitalizados mediante la tarjeta DVC-USB y el software Dazzle MovieStar (V. 4.5) que grababa el vídeo *in vivo* del experimento y permite el análisis de comportamientos no susceptibles de automatización.

Los vasos con agua en los que se introducen los animales están iluminados por una luz difusa que permitía el correcto seguimiento de los movimientos de los ratones.

Los parámetros analizados en los ensayos fueron el tiempo de inmovilidad, de movilidad y fuerte movilidad (estos dos últimos no representados)

Los compuestos evaluados en los ensayos *in vivo* de la presente invención son los más activos en los ensayos *in vitro* de inhibición de la MAO-A humana reportados por nuestro grupo de investigación (Eduardo Sobarzo-Sánchez, Matilde Yañez Jato,

Francisco Orallo Cambeiro, Eugenio Uriarte Villares y Ernesto Cano Rubio, “*Use of oxoisoaporphines and their derivatives thereof as selective inhibitors of monoamine oxidase A*”, 2008, WO/2009/034216), siendo los compuestos denominados **OXO 3** (IC₅₀ 13,65 nM) y **OXO 4** (IC₅₀ 0,84 nM), los utilizados para los distintos ensayos como compuesto libre y encapsulado y administrado por vía intraperitoneal.

Test de natación forzada (FST)

El test se realizó de acuerdo con el método desarrollado por Porsolt et al. (Porsolt, R. D.; Le Pichon, M.; Jalfre, M. *Nature* 1977, 266, 730 – 732) para ratones. El ensayo comenzó con la administración aguda de la molécula a analizar y después de un tiempo establecido (15, 30, 45 minutos), cada ratón se introdujo en un vaso de plástico de 3 litros (19,5 cm de altura, 12 cm de diámetro), lleno con agua a una temperatura de 25 ± 0,5°C, y con una profundidad de 14,5 cm. La profundidad del agua se eligió de tal forma que los animales debían nadar o flotar sin que sus patas traseras o su cola tocaran el fondo del vaso y que no pudieran salir de éste. Para el test, cada ratón se introdujo en el vaso durante 6 minutos y, después de una intensa actividad inicial, los ratones adquirieron una postura característica de inmovilidad.

El parámetro a evaluar fue el tiempo que cada ratón estuvo flotando (es decir, el tiempo durante el cual los ratones hicieron sólo los movimientos necesarios para mantener sus cabezas fuera del agua) ya que cuanto menor fuese este tiempo (tiempo de inmovilidad), mayor actividad antidepressiva de la molécula a evaluar, ya que la inmovilidad se considera un índice de desesperación y de depresión del humor. De este modo los ratones estaban más tiempo inmóviles, sin realizar movimientos de natación y escape, en presencia de un vehículo que si se le administraba un antidepressivo.

Tal y como sugirió Porsolt et al., sólo los datos medidos durante los 4 últimos minutos fueron analizados y presentados (Figuras 5a y 5b).

Las moléculas se administraron por vía intraperitoneal (ip.) 15, 30 o 45 minutos (min.) antes de la prueba a una dosis de 1 mg/kg.

Los compuestos libres (**OXO 3** y **OXO 4**) se suspendían en carboximetilcelulosa al 1% (CMCNa) por su naturaleza hidrofóbica. Dicho compuesto además de utilizarse como vehículo para la administración de las moléculas también se utilizaba como sustancia control.

Resultados experimentales-Test de natación forzada (FST)

Se presentan los resultados del tiempo de inmovilidad de los ratones en el FST de las oxoisoaporfinas **OXO 4** y **OXO 3**, tanto las moléculas libres como nanoencapsuladas (**PCL-OXO 4** y **PCL-OXO 3**).

5

Tiempo de inmovilidad de OXO 4

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos en el test de Porsolt et al. cuando se evaluó el compuesto OXO 4 suspendido en CMCNa 1% a 15, 30 y 45 minutos. Como control se utiliza la CMCNa 1%. Se observa una disminución estadísticamente significativa del tiempo de inmovilidad a los 15 min. ($69,03 \pm 8,99$, $p < 0,01$), 30 min. ($100,5 \pm 14,94$, $p < 0,05$) y 45min. ($64,10 \pm 7,83$, $p < 0,01$) respecto al grupo de animales tratados sólo con el vehículo-grupo control ($140,2 \pm 9,11$). Estos datos muestran una clara actividad antidepresiva de la molécula OXO-4 en el FST mantenida en el tiempo.

En la Figura 7 se recogen los datos obtenidos con el derivado encapsulado de la molécula OXO 4, la PCL-OXO 4. En esta figura se observa un retraso en el comienzo de la acción con una disminución del tiempo de inmovilidad a los 15min ($88,97 \pm 17,85$) inferior a la obtenida a los 30 min. ($69,51 \pm 12,17$, $p < 0,01$) y 45 min ($76,69 \pm 13,68$, $p < 0,05$) con respecto del control ($135,90 \pm 13,11$).

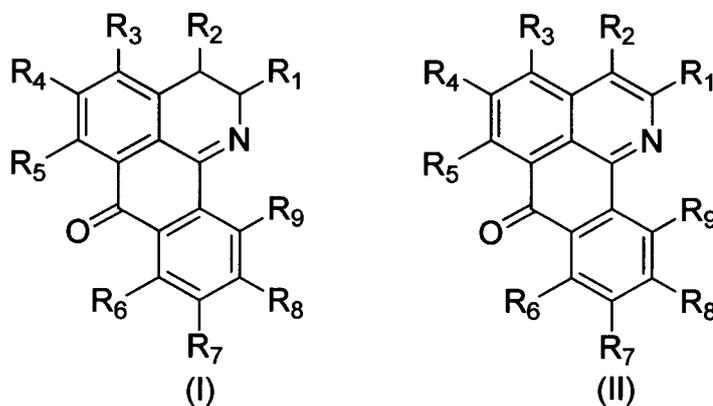
Tiempo de inmovilidad de OXO 3

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos con la molécula OXO 3 suspendida en CMCNa 1% a 15, 30 y 45 minutos en el test de Porsolt et al. Como control se utiliza la CMCNa 1%. Se observa una reducción del tiempo de inmovilidad a 15 min. ($86,88 \pm 13,91$, $p < 0,05$) tras la administración de la nueva molécula OXO 3 que es superior a la observada a los 30 min. ($110,60 \pm 10,62$, n.s.). No obstante, la mayor reducción se obtuvo a los 45 min. ($77,20 \pm 13,91$ $p < 0,01$) con respecto del control ($140,20 \pm 9,10$).

En la Figura 9 se muestran los datos del derivado encapsulado PCL-OXO 3 con reducciones del tiempo de inmovilidad a los 15 ($121,20 \pm 17,73$) y 30 min. ($92,54 \pm 16,44$) no estadísticamente significativos con respecto al control ($135,90 \pm 13,11$). Por el contrario, sí se observa una disminución estadísticamente significativa a los 45 min. ($73,14 \pm 9,60$, $p < 0,05$). Los datos presentados nos indican que se produce un retraso considerable en la aparición de la actividad antidepresiva con respecto a la molécula libre (no encapsulada).

REIVINDICACIONES

1. Sistema de nanocápsulas caracterizadas por un tamaño medio inferior a 1 μm que comprende un polímero, un agente tensioactivo, un aceite y un compuesto seleccionado de entre los compuestos de fórmula I y II, sus sales, hidratos, solvatos y N-óxidos,



5

donde:

$-R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8,$ y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloheteroalquilo, arilo, $-OR^b$ y $-NR^aR^b$;

10 $-R^a$ y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo o, alqueno, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, heteroarilo, o, R^a y R^b conjuntamente forman un anillo de heterociclo, de 4 a 7 miembros conteniendo 0-2 heteroátomos independientemente seleccionados entre oxígeno, azufre y $N-R^c$, donde R^c se selecciona entre hidrógeno, alquilo, y $-C(O)R^b$.

15 2. Sistema según la reivindicación 1 donde el compuesto se selecciona entre los compuestos:

2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

5-metoxi-2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

20 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

5-metoxi-6-hidroxi-2,3-dihidro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

5-metoxi-6-hidroxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

3. Sistema según la reivindicación 1 y 2, donde el polímero se selecciona de entre de
25 entre poliestireno, poliéster, polifosfazina, polietilenglicol, polivinil alcohol, poliacrilamida, poliacrilato, polivinil pirrolidinona, polialilamina, polietileno, ácido

poliacrílico, polimetacrilato, polisiloxano, polioxietileno, celulosa, quitosano, poli-hidroxitbutarato y sus derivados.

4. Sistema según la reivindicación 3, donde el polímero es poli-epsilon-caprolactona.

5. Sistema según la reivindicación 1, donde el aceite se selecciona de entre hidrocarburos alifáticos saturados y no saturados, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos cíclicos y acíclicos, triglicéridos de cadena carbonada C1-C24 saturados o no saturados.

6. Sistema según la reivindicación 1, donde el aceite se selecciona entre aceite de girasol, oliva, soja, palma y colza.

10 7. Sistema según la reivindicación 1, donde el agente tensioactivo se selecciona entre etoxilato de aceite de castor, Pluronic F68 (copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno), BRIJ (estearato), Tween 20 (polisorbato 20), Tween 40 (polisorbato 40), Tween 60 (polisorbato 60), Tween 80 (polisorbato 80), lauril sulfato sódico, Crillet 1, Crillet 4 HP, Crillet 4 NF, Cremophor RH40, Cremophor RH60, Cremophor EL, Etocas
15 30, Mkkol HCO-60, Labrasol, Acconon MC-8, Gelucire 50/13, Gelucire 44/14, MYRJ, polioxameros, Epikuron 170, fosfolípidos, Span (monoestearato de sorbitan), glicerol monoestearato, Capmul MCM (caprílico/capríco glicérido), Capmul MCM 8, Capmul MCM 10, Imwitor 988, Imwitor 742, Imwitor 308, Labrafil M 1944 CS, Labrafil M 2125, Capryol PGMC, Capryol 90, Lauroglycol, Captex 200, ácido graso etoxilado,
20 Plurol oleico (poligliceril-6-dioleato), Crill 1 (laurato de sorbitan), Crill 4 (oleato de sorbitan), Maisine (monolinoleato de glicerina), Peceol (gliceril oleato) y Arlacel P135 (polietilenglicol dipolihidroxiestearato).

8. Procedimiento para la preparación de los sistemas, como se definieron en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:

- 25 i) preparar una fase orgánica que comprende un disolvente orgánico, un polímero, un aceite y un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por los compuestos de fórmula I y II, como se definieron en la reivindicación 1, sus sales, hidratos, solvatos y N-óxidos,
- j) preparar una fase acuosa que comprende al menos un agente tensioactivo,
- 30 k) mezclar las fases preparadas en las etapas a) y b), y
- l) eliminar el disolvente.

9. Composición farmacéutica que comprende los sistemas de nanocápsulas según se han descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Uso de los sistemas de nanocápsulas según se han descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento.
- 5 11. Uso según la reivindicación 10, donde el medicamento es para el tratamiento de desórdenes nerviosos.

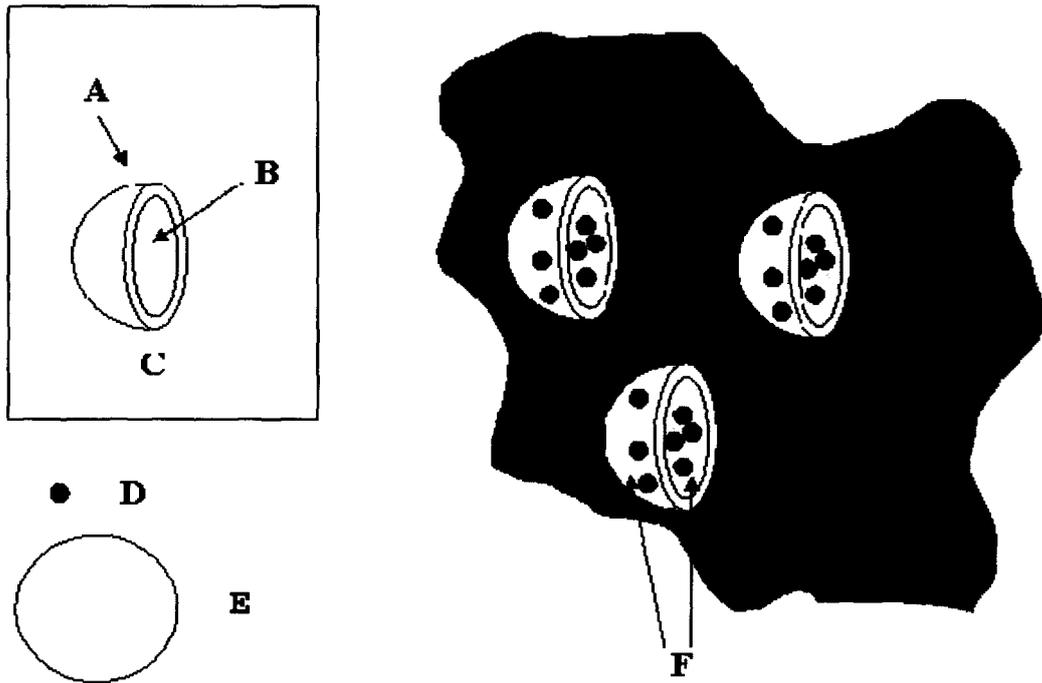


FIGURA 1

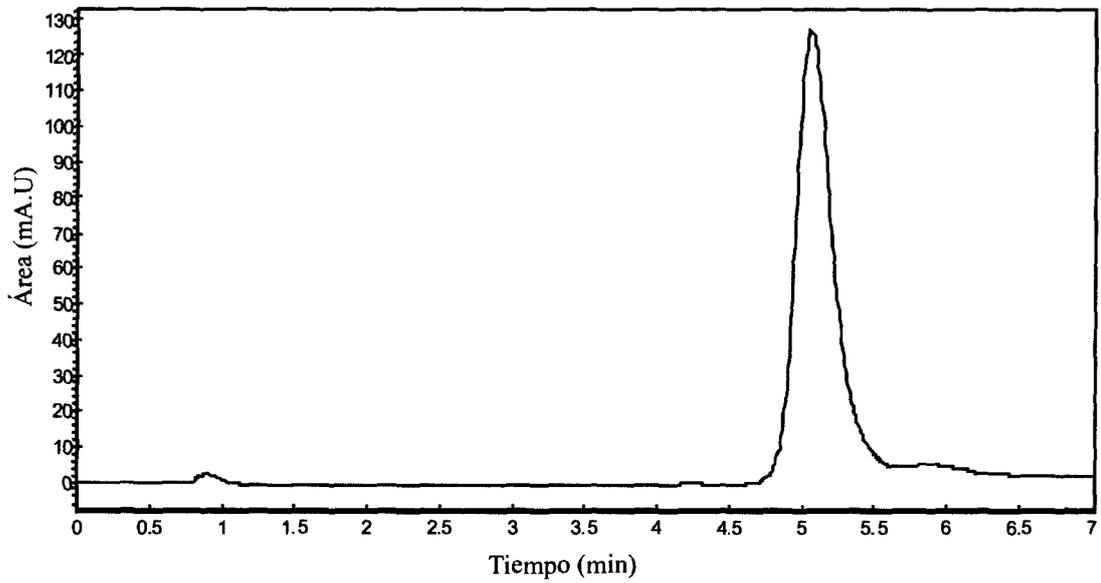


FIGURA 2

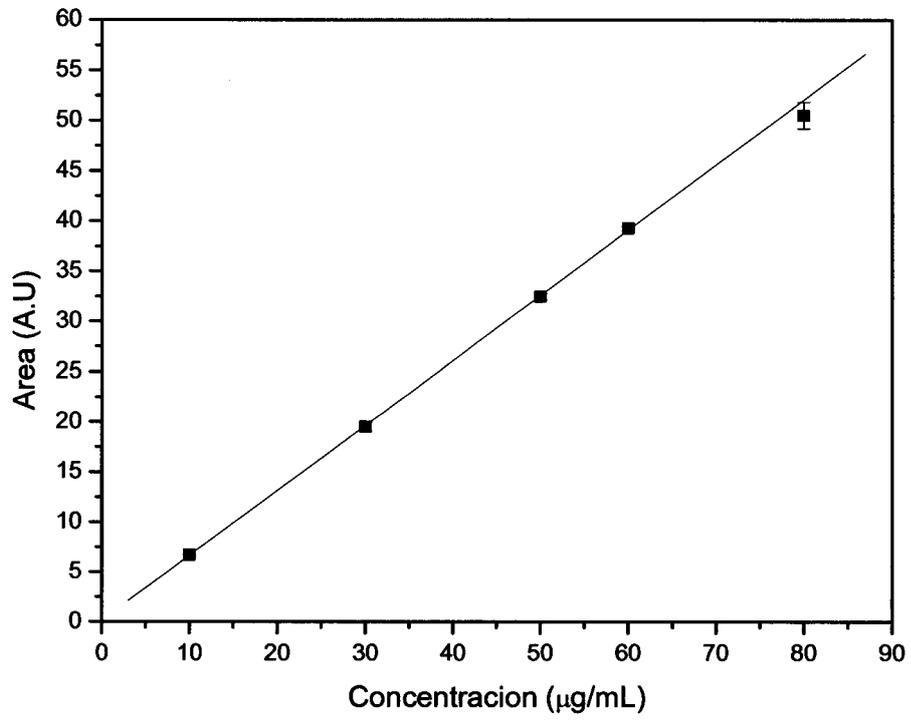


FIGURA 3A

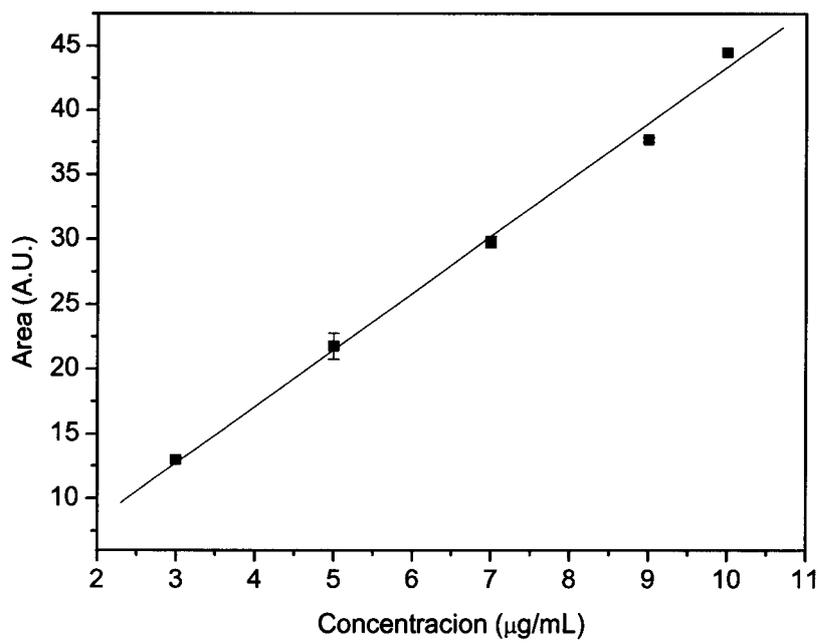


FIGURA 3B

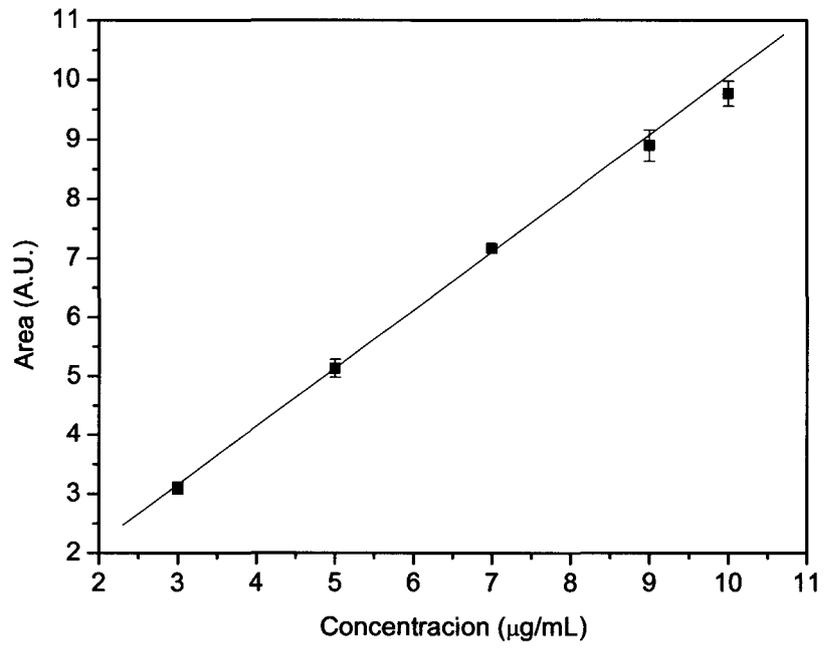


FIGURA 3C

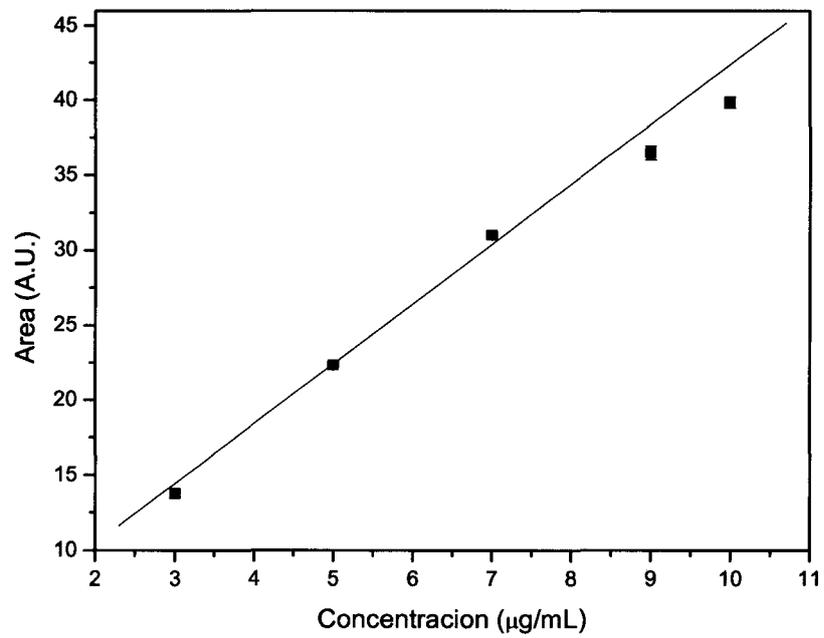


FIGURA 3D

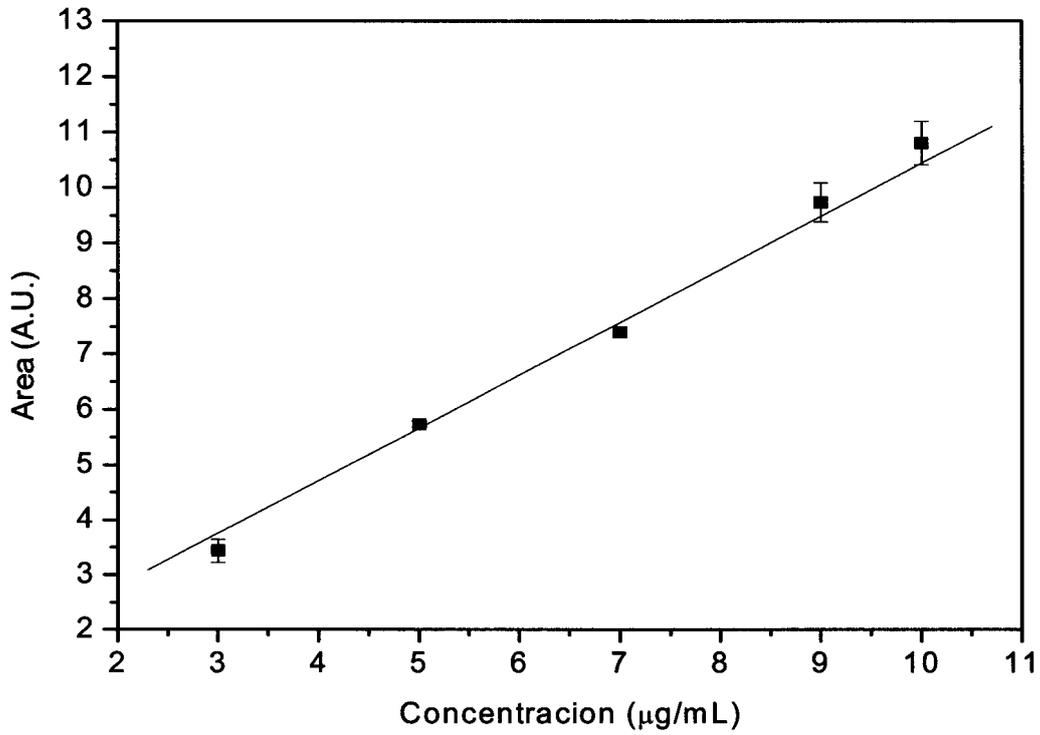


FIGURA 3E

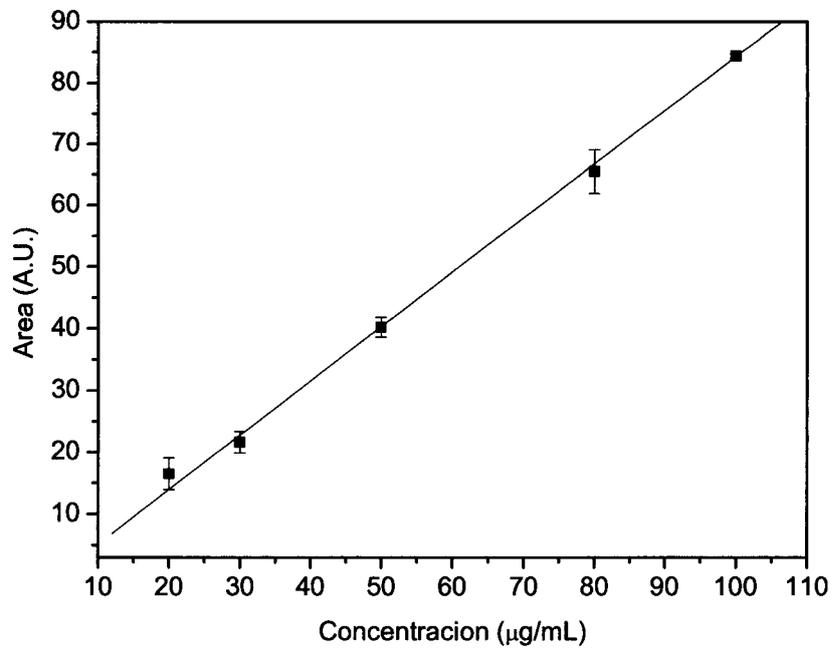


FIGURA 3F

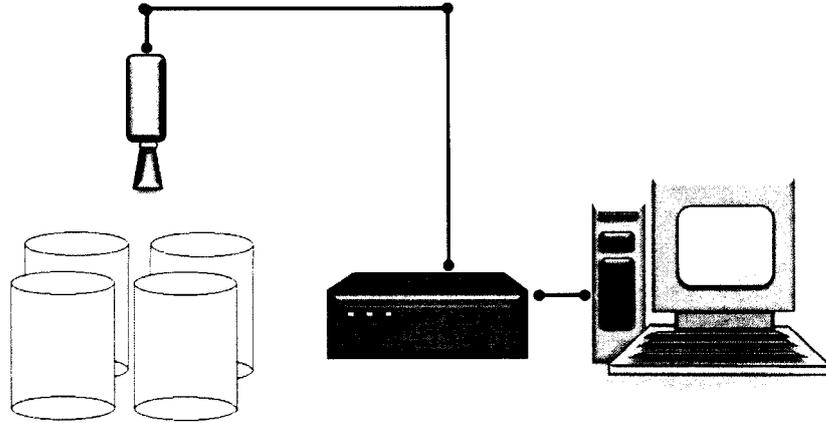


FIGURA 4

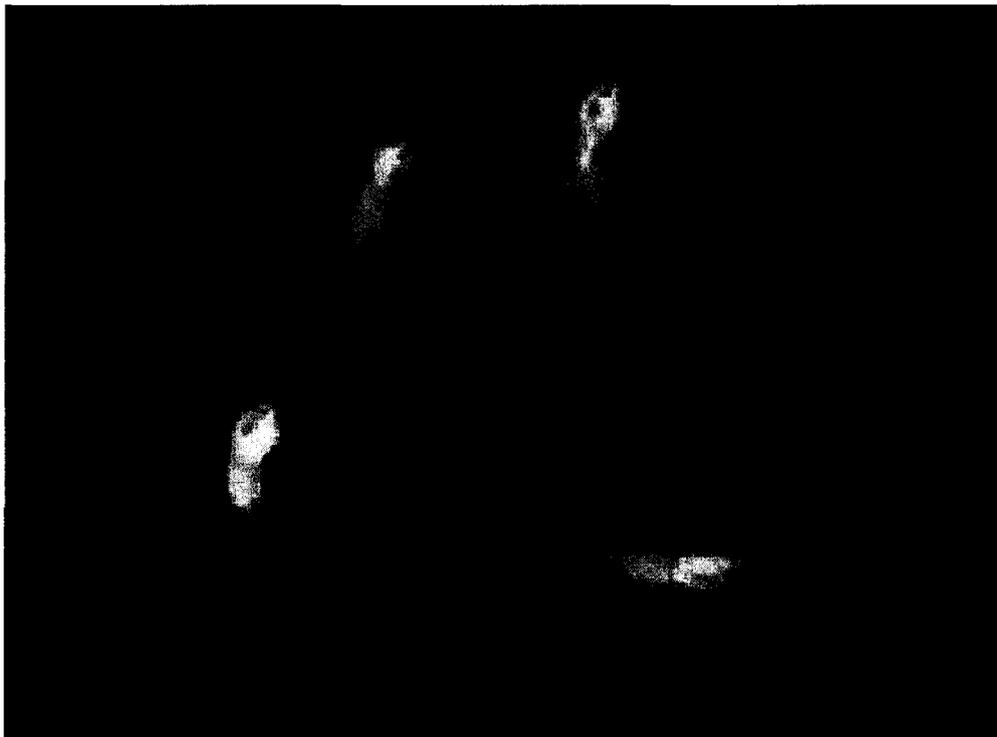


FIGURA 5a

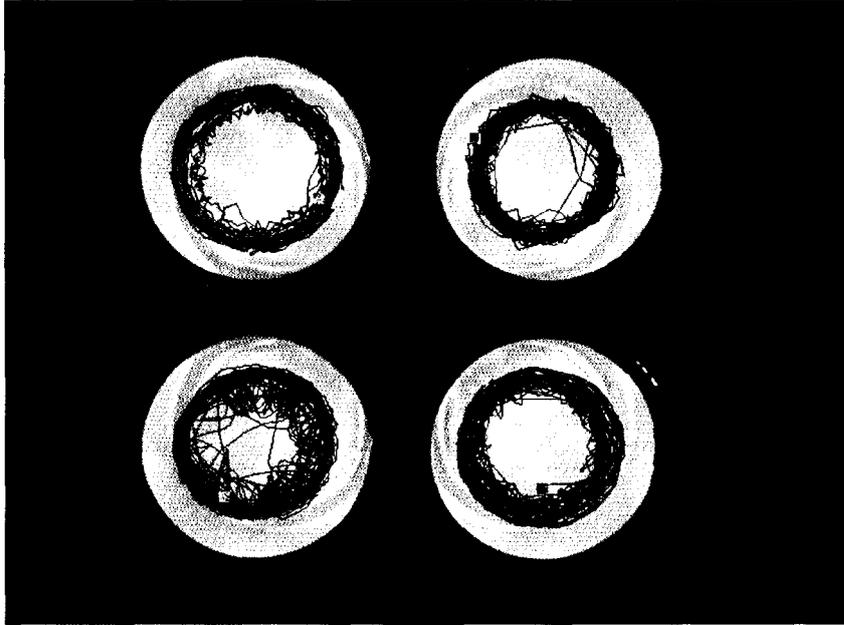


FIGURA 5b

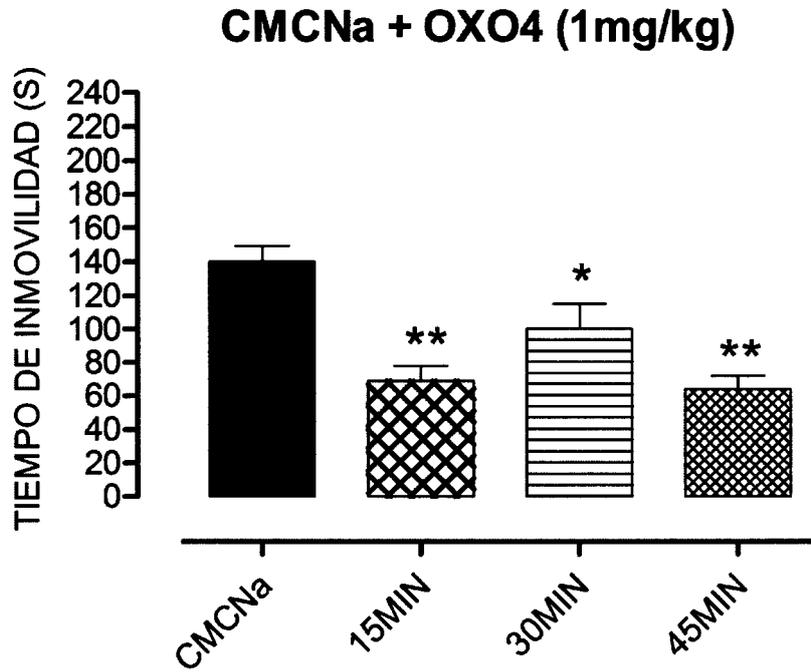


FIGURA 6

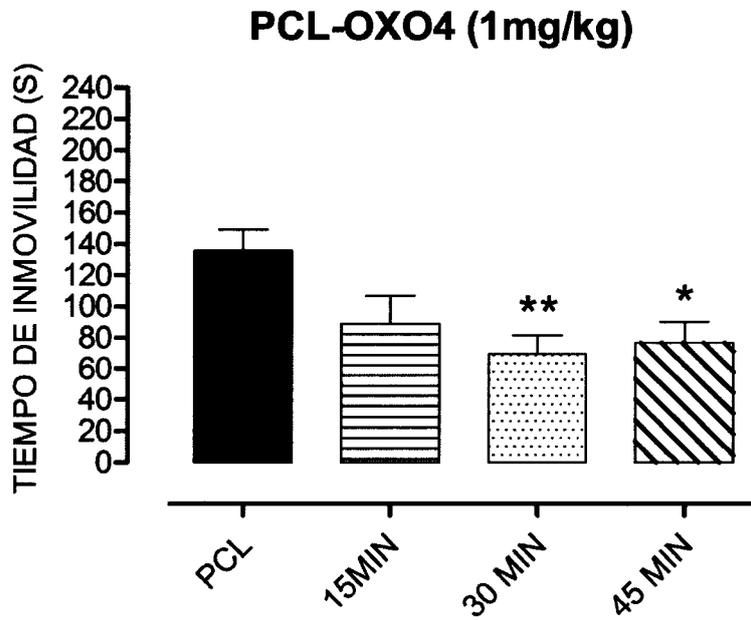


FIGURA 7

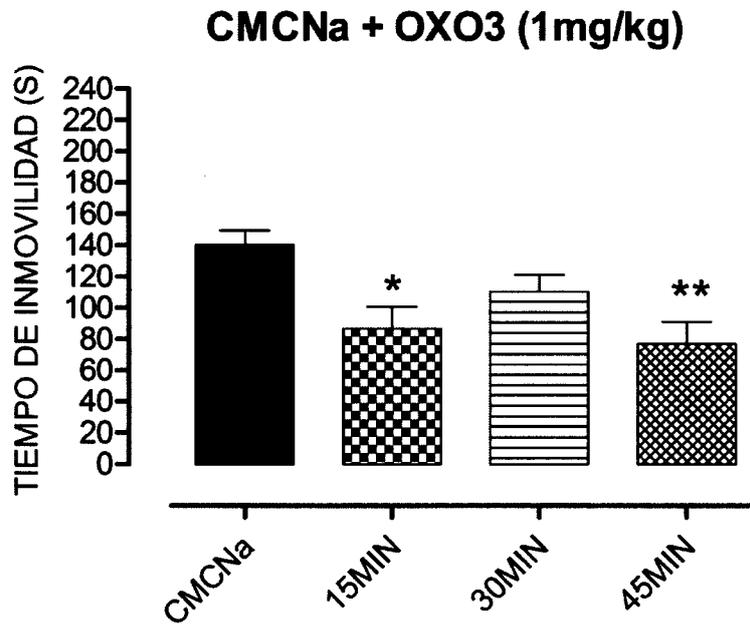


FIGURA 8

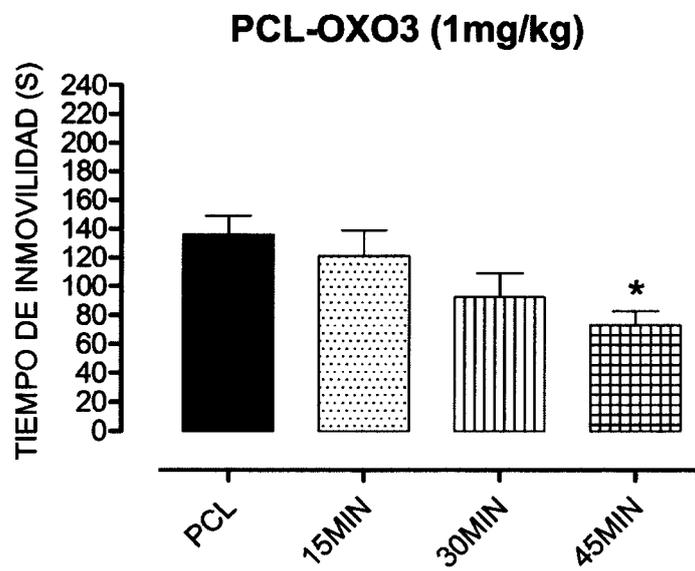


FIGURA 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201101095

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2009034216 A1 (UNIV SANTIAGO COMPOSTELA) 19/03/2009, todo el documento.	1-11
A	US 2005175651 A1 (SIMONNET JEAN-THIERRY ET AL.) 11/08/2005, todo el documento.	1-11
A	US 2006040900 A1 (NEUMEYER JOHN L ET AL.) 23/02/2006, párrafos [0064]-[0085].	1-11
A	BRPI0805156 A2 (UNIV. FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL) 17.08.2010 (resumen). [en línea][recuperado el 10.12.2012]. Recuperado de: WPI Database; DW201119; nº acceso 2010-M09254[19].	1-11

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
18.12.2012

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/51 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61K31/473 (2006.01)

A61K47/34 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

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

A61K, B82Y, A61P

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	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	WO 2009034216 A1 (UNIV SANTIAGO COMPOSTELA)	19.03.2009
D02	US 2005175651 A1 (SIMONNET JEAN-THIERRY et al.)	11.08.2005
D03	US 2006040900 A1 (NEUMEYER JOHN L et al.)	23.02.2006

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 de nanocápsulas caracterizadas por un tamaño medio inferior a 1 micrómetro que comprende un polímero, un agente tensioactivo, un aceite y un compuesto derivado de oxoisoaporfina de fórmula I y II. Se refiere también a su procedimiento de obtención, a la composición farmacéutica que lo contiene y al uso de dicho sistema en la preparación de un medicamento para el tratamiento de desórdenes nerviosos.

El documento D01 divulga el uso de compuestos que responden a las fórmulas I y II de la solicitud como agentes inhibidores de la monoamino oxidasa A, en el tratamiento de desórdenes de comportamiento tales como depresión, trastornos bipolares, etc. En los ejemplos se preparan formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos relacionados con la depresión, en forma de tabletas, cápsulas o solución inyectable.

El documento D02 divulga nanocápsulas de tamaño menor o igual a 1 micrómetro, que comprenden un núcleo que incluye aceite y un principio activo, y una cubierta de un polímero insoluble en agua, por ejemplo policaprolactona (párrafo [0050], ejemplo 4).

El documento D03 divulga el uso de derivados de hidroxiaporfinas para el tratamiento de trastornos depresivos. Entre las posibles formulaciones farmacéuticas para la administración de dichos compuestos se citan las nanopartículas (párrafos [0072], [0074], [0077]).

Ninguno de los documentos citados divulgan un sistema de nanocápsulas de tamaño medio inferior a 1 micrómetro que comprenda un compuesto derivado de oxoisoaporfina de fórmula I y II, un polímero, un agente tensioactivo y un aceite, como se recoge en la reivindicación 1.

Por tanto, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1-11 de la solicitud son nuevas e implican actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).