

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 544**

21 Número de solicitud: 201131812

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 47/14** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.11.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.05.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA**  
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ BARREIRO, Alejandro;**  
**SEIJO REY, Begoña;**  
**KONAT ZORZI, Giovanni y**  
**SANTANA CARVALHO, Edison Luis**

74 Agente/Representante:

**TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana**

54 Título: **SISTEMAS NANOPARTICULARES ELABORADOS A BASE DE ÉSTERES DE SORBITÁN.**

57 Resumen:

Sistemas nanoparticulares elaborados a base de ésteres de sorbitán. La presente invención se refiere a sistemas que comprenden nanopartículas homogéneas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro que comprenden, al menos un éster de sorbitán, un éster de macrogol, un éter de macrogol o un derivado de los mismos y, opcionalmente, al menos un componente derivado de oxietileno y/o al menos un componente dotado de carga eléctrica (positiva o negativa); donde los componentes se incorporan en una única etapa consistente en la mezcla de dos disoluciones. Al uso de los mismos como medicamentos, productos sanitarios o en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa, o con aplicaciones cosméticas, de higiene, nutricionales y de recubrimiento de superficies así como a procedimientos para su preparación.

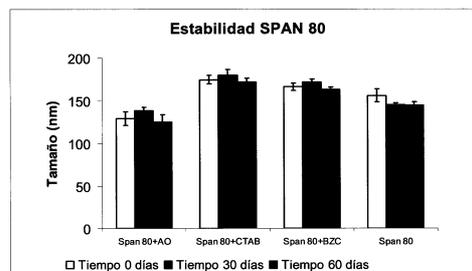


Figura 3

## DESCRIPCIÓN

Sistemas nanoparticulares elaborados a base de ésteres de sorbitán

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

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

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

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

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

En el segundo de los casos, lo que se consigue es obtener geles macroscópicos empleando elevados porcentajes de ésteres de sorbitán (Bari, H., *International Journal of Pharmaceutical Sciences*

Review and Research, Volume 3, Issue 1, July – August 2010; Article 001), (Murdan, Gregoriadis and Florence, International Journal of Pharmaceutics 180 (1999) 211–214) (Murdan, Gregoriadis and Florence, J Pharm Sci., Vol. 88, No. 6, June 1999).

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

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

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

B) Microemulsiones (LIU Hai-shui, LI Tie-long, JIN Zhao-hui, GONG Yan-zhang, ZHANG Yun-xia, Microemulsion with Span®/Tween as Mixed-surfactant and Synthesis of Iron Nanoparticles, 15 The Chinese Journal of Process Engineering, DOI CNKI-ISSN: 1009-606X.0.2007-01-013) (EP1961412A1);

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

20 Los liposomas son vesículas coloidales en las que una membrana de estructura bilaminar compuesta de lípidos de diferentes naturaleza, encierra o encapsula una parte de la fase acuosa en la que los propios liposomas se encuentran dispersos. La unidad básica de la estructura de los liposomas es, por tanto, la bicapa lipídica que constituye la membrana vesicular, cuya formación tiene lugar espontáneamente en presencia de agua. A esta formación espontánea se han ido incorporando 25 niveles de sofisticación en su estructura y procedimiento de obtención, mejorando de esta forma su capacidad para actuar como sistemas de liberación de fármacos y, en la misma medida, sus posibles aplicaciones terapéuticas. La composición lipídica, el tamaño de partícula o vesícula, el número de lamelas o bicapas que forman la pared, así como la composición de las fases acuosas interna y externa o el método de preparación, determinan las características físico-químicas de las vesículas, su capacidad para la encapsulación de fármacos, y también su estabilidad y comportamiento tanto *in vivo* como *in vitro*. Los liposomas son considerados sistemas transportadores de fármacos. Sin embargo, a pesar del gran interés, existen importantes problemas, relacionados sobre todo con la estabilidad del sistema en los fluidos corporales y, en particular, en el torrente sanguíneo, en donde se produce una excesiva pérdida de fármaco y una rápida intercepción del sistema, con la consiguiente retirada del mismo de la circulación, por las células del sistema fagocítico mononuclear (MPS) Andresen et al., Progress in Lipid Research 44 (2005) 68–97. Tal constatación representa un obstáculo para los liposomas como sistemas de transporte de fármacos. Además se comprobó que, en general, los liposomas presentan una capacidad de encapsulación limitada, sobre todo frente a fármacos hidrofílicos, así como un tamaño heterogéneo, observándose con frecuencia 35 una falta de reproducibilidad de las formulaciones elaboradas, siendo, esas características también relacionadas con los métodos de preparación de los mismos Lian y Ho, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 90, NO. 6, JUNE 2001, 667-680.

Los tres tipos de sistemas anteriores presentan un grave problema en lo que respecta a su estabilidad. Los sistemas vesiculares y emulsiones son conocidos por experimentar fenómenos de

agregación y la dificultad para obtener formulaciones más estables mediante procesos como la liofilización sin alterar significativamente sus características iniciales. En este sentido, no debemos olvidar que para la propia formación de tales sistemas es preciso un considerable aporte energético y/o el empleo de combinaciones específicas de agentes tensioactivos, por lo que el producto  
5 obtenido se encuentra en una situación energéticamente desfavorable o inestable. Además, se trata de sistemas especialmente sensibles a variaciones en el entorno como la temperatura.

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

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

Sin embargo, no es posible preparar nanopartículas en base a ésteres de sorbitán siguiendo las enseñanzas del estado de la técnica, considerando como más próximo las nanopartículas constituidas por componentes lipofílicos como las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (Rainer H. Müller, Karsten Maeder, Sven Gohla, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (2000) 161±177), (S.A. Wissinga, O. Kayserb, R.H. Müller, Advanced Drug Delivery Reviews 56 (2004) 1257– 1272).  
15

Uno de los métodos para preparar nanopartículas empleando excipientes de baja hidrosolubilidad como los poliésteres, es el conocido como emulsificación-evaporación, recogido por ejemplo en el artículo científico de Gref y col., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51, 2001, 111-118. Cuando se sigue el método descrito en el punto 2.2 de la página 112, empleando como único componente en la fase orgánica ésteres de sorbitán, no se obtienen nanopartículas sino un agregado (ver ejemplo 1A de la presente memoria).  
20

Asimismo, al tratar de emplear otra técnica como la de nanoprecipitación (Paolicelli y col., Nanomedicine, 5, 2010, 843-853), frecuente en el desarrollo de nanopartículas lipídicas, nuevamente se puede confirmar que una técnica con la que es posible obtener con facilidad nanopartículas basadas en componentes de baja hidrosolubilidad resulta ineficaz para el desarrollo de nanopartículas con cualquier contenido porcentual en masa de un éster de sorbitán (ver ejemplo  
25 1B de la presente memoria).  
30

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

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

Además es posible la incorporación de diversos componentes adicionales. Estos componentes adicionales permiten modular las características del sistema confiriéndole una gran versatilidad en

términos de características físico-químicas y de interacción con otros componentes, y facilitan la incorporación de ingredientes activos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

a) preparar una fase orgánica que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%;

5 b) mezclar bajo agitación la disolución obtenida en a) con una disolución acuosa.

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

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

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

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

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

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

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

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

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

Las nanopartículas de los sistemas de la invención poseen una estructura matricial que permite incorporar componentes adicionales que aumentan y mejoran su estabilidad, como por ejemplo polímeros aniónicos y/o catiónicos y modificaciones con óxido de etileno. En una realización particular de la invención, las nanopartículas comprenden adicionalmente una sustancia catiónica,

5 aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos, en una proporción en peso entre el 0% y 40% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula. En una realización particular, la proporción en peso de la sustancia catiónica, la sustancia aniónica, el derivado de óxido de etileno o la combinación de los mismos, está comprendida entre 0% y 20% respecto al peso total de los componentes de la nanopartícula; más particularmente entre 0% y 10%.

10 Por otra parte, las nanopartículas presentan carga eléctrica (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede ser modulada mediante una adecuada selección de la composición del sistema. Concretamente, dicha carga eléctrica puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de los componentes del sistema y la proporción existente entre los mismos. El potencial zeta de las nanopartículas de los sistemas de la invención puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental de la presente memoria descriptiva.

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

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

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

### **Componentes del sistema**

#### **Ésteres de sorbitán**

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

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

40 Se entiende por “alquilo” una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que no contiene ninguna insaturación, de 1 a 24 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre  $-OR^b$ ,  $-SR^b$ ,  $-NR^aR^b$ ,  $-C(O)R^b$ ,  $-CO_2R^b$ ,  $-C(O)NR^aR^b$ ,  $-NR^aC(O)R^b$ , -

$\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{OCF}_3$ ; donde  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, alquenilo y alquinilo.

5 “Alquenilo” y “alquinilo” en los compuestos de la presente invención se refieren a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene al menos una insaturación, de 2 a 24 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre  $-\text{OR}^b$ ,  $-\text{SR}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}^b$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{OCF}_3$ ; donde  $\text{R}^a$  y  $\text{R}^b$  son como se definieron previamente.

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

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

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

#### Componentes opcionales

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

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

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

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

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

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

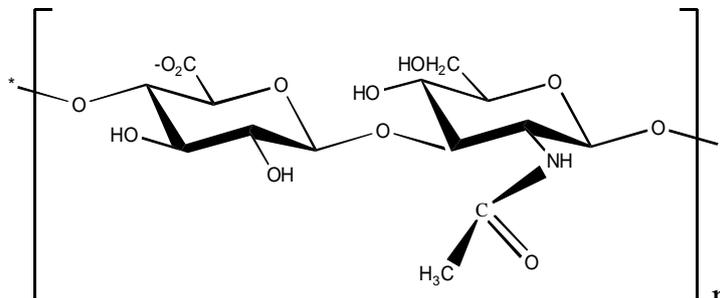
35 En una realización particular, las sales de amonio se seleccionan entre bromuro de cetil trimetil amonio y cloruro de benzalconio. En otra realización particular, la amina grasa es oleilamina (*cis*-1-amino-9-octadeceno).

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

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

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

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

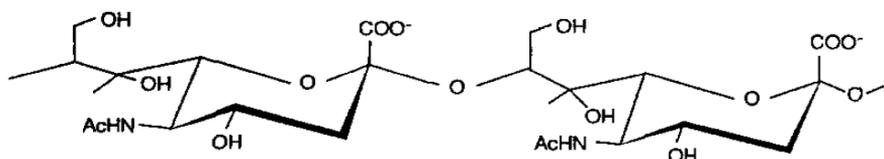


en la que el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacárido en la cadena de hialuronano.

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

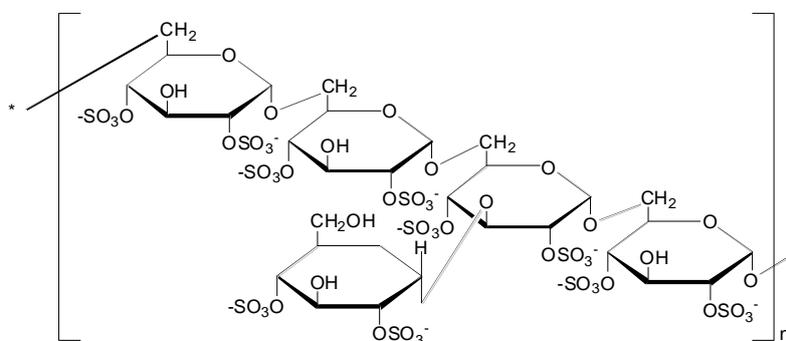
20 El término “hialurónico, ácido hialurónico, hialuronano” tal como se utiliza en la presente descripción incluye o bien el ácido hialurónico o bien una base conjugada del mismo (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina del ácido hialurónico que incluyen sales inorgánicas tales como,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

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



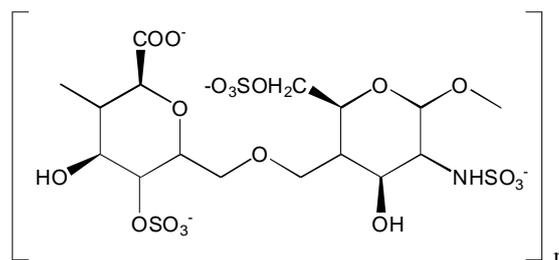
Se trata de un material de indudable interés en el campo farmacéutico y cosmético, por ser biocompatible y biodegradable, no inmunogénico, cuyos productos de degradación no son tóxicos (Gregoriadis G et al. Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57, 1964–1969). Por otro lado, los ácidos polisiálicos están caracterizados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

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



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

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



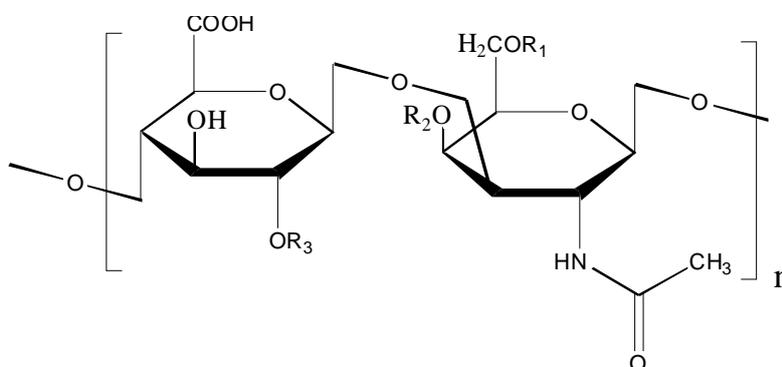
donde n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de heparina.

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

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

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

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



15 en la que *n* es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacáridos en la cadena de sulfato de condroitina y en la que *R*<sub>1</sub>, *R*<sub>2</sub> y *R*<sub>3</sub> son independientemente hidrógeno o un grupo SO<sub>3</sub>H. Cada monosacárido puede dejarse sin sulfatar, sulfatarse una vez, o sulfatarse dos veces. La sulfatación está mediada por sulfotransferasas específicas.

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

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

- sulfato de condroitina A que está sulfatado predominantemente en el carbono 4 del azúcar *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y que también se conoce como sulfato de 4-condroitina (*R*<sub>1</sub>=H, *R*<sub>2</sub>=SO<sub>3</sub>H y *R*<sub>3</sub>=H)
- 25 - sulfato de condroitina B que se denomina también sulfato de dermatano. Esta sustancia está compuesta por unidades de repetición lineales que contienen *N*-acetilgalactosamina y o bien ácido *L*-idurónico o bien ácido glucurónico, y cada disacárido puede estar sulfatado una vez o sulfatado dos veces. Está presente mayoritariamente en la piel, pero también se encuentra en vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendones y pulmones.
- 30 - sulfato de condroitina C que está sulfatado predominantemente en el carbono 6 del azúcar GalNAc y que se conoce también como sulfato de 6-condroitina (*R*<sub>1</sub>=SO<sub>3</sub>H, *R*<sub>2</sub>=H y *R*<sub>3</sub>=H);
- sulfato de condroitina D que está sulfatado predominantemente en el carbono 2 del ácido glucurónico y en el carbono 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina (*R*<sub>1</sub>=SO<sub>3</sub>H, *R*<sub>2</sub>=H y *R*<sub>3</sub>=SO<sub>3</sub>H);

- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 4,6-condroitina ( $R_1=SO_3H$ ,  $R_2=SO_3H$  y  $R_3=H$ );

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

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

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

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

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

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

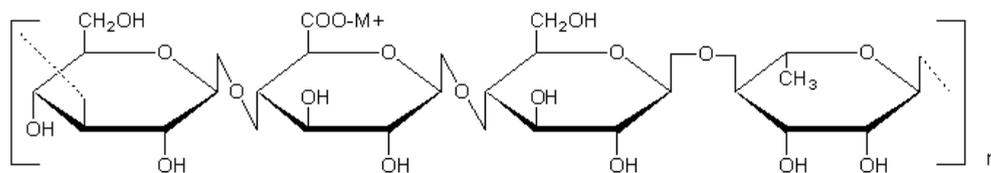
El glucomanano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica lineal con una pequeña proporción de ramificaciones. En concreto, está formado por unidades de D-manosa y D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 en una proporción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

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

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

Se representa mediante la siguiente estructura:

5



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

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

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

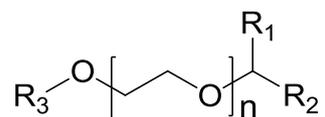
i) una sustancia catiónica seleccionada del grupo constituido por sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas, y/o

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

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

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

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



30 donde  $\text{R}_1$  es un grupo carbonilo o hidrógeno;  $\text{R}_2$  es un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo, de entre 2 a 24 átomos de carbono;  $\text{R}_3$  es hidrógeno o un grupo alquilo de entre 1 a 6 átomos de carbono;  $n$  es un valor de entre 1 y 100. En una realización particular,  $n$  tiene un valor de entre 1 y 50, más preferiblemente entre 1 y 24.

35 Ejemplos de derivados de óxido de etileno, sin limitarse a éstos, son polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), polietilenglicol hexadecil éter (Brij 56), polietilenglicol 2-octadecil éter (Brij 72),

polietilenglicol 8-octadecil éter (Brij 78), polietilenglicol 8-estearato (Myrj 45), 2-hidroxiethyl octadecanoato (Myrj 52), monoestearato de etilen glicol, monoestearato de trietilen glicol.

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

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

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

### **Ingrediente activo**

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

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

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

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

De forma preferida, el ingrediente activo puede:

- tener actividad antifúngica, antiséptica o antiinflamatoria,
- ser de aplicación, en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa o en terapia celular, como por ejemplo un factor de crecimiento,
- ser de interés en cosmética o higiene, como por ejemplo un péptido o proteína, o bien un derivado de ácido nucleico, tal como un plásmido de ADN, oligonucleótido, ARN de interferencia o un

polinucleótido. El plásmido de ADN es aquel que incorpora material genético para ser introducido en células y expresar proteínas o bien que actúe como precursor de RNA.

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

10 En otra realización preferida, las nanopartículas de la presente invención comprenden, adicionalmente, al menos un marcador. En la presente invención se entiende como “marcador” aquel elemento, compuesto, célula o conjunto de células que permita realizar un estudio de localización del mismo, obtener una imagen, señal o información del lugar o los lugares en los que se distribuye, determinar un parámetro bioquímico, inmunológico o metabólico o bien realizar un diagnóstico. Son ejemplos de marcadores una molécula fluorescente, como por ejemplo  
15 fluoresceína o Texas Red; quantum dots; un isótopo radiactivo; un agente de contraste, por ejemplo radiológico, de resonancia o de tomografía; un antígeno de membrana; un agente de tinción, etc.

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

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

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

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

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

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

- Como se ha descrito anteriormente, las nanopartículas de la invención pueden formar parte de una composición nutricional. Dicha composición nutricional puede ser un alimento, un suplemento dietético o un suplemento nutricional. Las composiciones nutricionales pueden incluir leche, yogures, zumos de fruta y de vegetales, postres, productos infantiles o productos deshidratados. La adición de las nanopartículas a la composición nutricional se realiza mediante mezcla y homogenización según el procedimiento técnico para elaborar cada producto. Adicionalmente, otros componentes tales como las vitaminas pueden añadirse a la composición nutricional. Ejemplos de estos compuestos son vitaminas del grupo A, B, C, D, E o mezclas de las mismas.
- Una realización particular, se refiere al uso de de las nanopartículas según se han definido anteriormente para la preparación de vacunas.
- Una realización preferida de la invención, se refiere al uso de las nanopartículas según se han definido anteriormente para su empleo en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y terapia celular.
- Según otra realización preferida, se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, como marcador.
- Según otra realización particular, la invención se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, para fines diagnósticos.
- Según otra realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, para su administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, pulmonar, ótica, vaginal, intrauterina, rectal, entérica o parenteral.
- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas, según se han definido anteriormente, en la preparación de un producto cosmético o de higiene personal para la administración sobre piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes o mucosas.
- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para terapia génica, silenciamiento o interferencia genética, o vacunación genética.
- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para producir la asociación, expansión o activación de poblaciones celulares o para manipular o alterar las características biológicas de células vivas tanto autólogas, como alogénicas, xenogénicas o de cultivos celulares y posteriormente emplear dichas células o grupos celulares para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico, preventivo o con fines regenerativos, o para modificar la producción de compuestos por dichas células, o para adaptarlas y asociarlas de modo efectivo a micropartículas o microcápsulas, matrices y andamiajes.
- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para facilitar, estimular o modificar la producción de compuestos por células, con fin de producción biotecnológica.
- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas con la finalidad de higiene o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado.
- Según una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para modificar, corregir o introducir propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad en un medicamento o en un producto cosmético o de higiene personal.

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

## 5 Procedimiento de preparación de las nanopartículas

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

a) preparar una fase orgánica que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%;

10 b) mezclar bajo agitación la disolución obtenida en a) con una disolución acuosa.

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

De este modo, la cadena lipofílica de ácido graso se quedará anclada en el seno de la estructura nanoparticular, mientras que las cadenas de óxido de etileno, por disponerse en el proceso de

formación dirigidas hacia la fase acuosa, se encontrarán en las nanopartículas resultantes dispuestas en la superficie de las mismas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## EJEMPLOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

no permite detectar nanopartículas en suspensión y no puede, por consiguiente, efectuar el correspondiente cálculo del tamaño medio de nanopartícula.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 La asociación del siRNA a los sistemas pudo ser confirmada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. La Figura 4 muestra uno de los geles obtenidos, concretamente para los sistemas elaborados empleando Span® 80 y con su carga superficial modificada mediante la incorporación de OA o CTAB. En dicho gel se pueden observar las bandas debidas a la presencia de siRNA.

Como se puede apreciar, cuando el siRNA se deposita en forma libre migra a lo largo del gel dando lugar a una banda característica (A). Las nanopartículas blancas no dan lugar a banda alguna, por no asociar siRNA (H e I). Por el contrario, cuando el siRNA ha sido asociado a las nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y OA, dicha banda no migra y permanece en los pocillos de salida del gel (B, C, y D), confirmando que no se encuentra en forma libre, sino eficazmente asociado a los sistemas nanoparticulares depositados en los pocillos de dicho gel. Una situación intermedia se observa cuando el siRNA se asocia a las nanopartículas elaboradas a base de Span® 80 y CTAB. Como se puede apreciar, la asociación es eficaz a bajas concentraciones de siRNA, no observándose migración de la banda (G). Sin embargo, a mayores concentraciones de siRNA (E y F), hay una débil banda que sale de los pocillos, indicando una migración parcial del siRNA o, en otras palabras, que el siRNA no ha quedado asociado a las nanopartículas en su totalidad.

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

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

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

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

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

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

Como se puede observar en la Tabla 4, los sistemas nanoparticulados presentan un tamaño de partícula homogéneo (caracterizado por un valor de PDI de aproximadamente 0,1), con un diámetro medio cercano a los 140 nm. Las nanopartículas elaboradas empleando exclusivamente Span® 20 presentan una potencial zeta negativo (de aproximadamente -30 mV) y éste potencial puede ser

modulado mediante la incorporación de la molécula catiónica OA. Resultados similares se obtuvieron empleando CTAB o BZC en lugar de OA, como se muestra en las Figuras 10 y 11, y Ejemplo 6. Concretamente, empleando dichas moléculas es posible llegar a invertir la carga superficial de negativa a positiva, llegando a alcanzar valores de alrededor de + 50 mV.

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

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

- 10 Los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 20 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA fueron empleados para asociar un ingrediente activo. Para ello se seleccionó siRNA, molécula cargada negativamente, que se incorporó por incubación a las nanopartículas mencionadas, de acuerdo con la metodología descrita en el Ejemplo 3. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 5.
- 15 **Tabla 5: Caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de monolaurato de sorbitán (Span® 20) asociando RNA interferente (siRNA). La carga superficial de dichas nanopartículas ha sido modulada mediante la incorporación de OA. (PDI: Índice de polidispersión)**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

asociación del sulfato de condroitina o ácido hialurónico mediante interacciones del tipo electrostático.

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

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

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

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

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

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

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

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

35 Los sistemas obtenidos fueron caracterizados haciendo uso de las técnicas descritas anteriormente. Los resultados de la caracterización de los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 9.

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

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

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

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

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

Tabla 10: Características de los éteres y ésteres de macrogol incorporados en una única etapa a las nanopartículas.

Nombre	Fórmula	Marca
Polietilenglicol dodecil éter	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH	Brij <sup>®</sup> 30
Polietilenglicol hexadecil éter	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> OH	Brij <sup>®</sup> 56
Polietilenglicol 2 octadecil éter	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	Brij <sup>®</sup> 72
Polietilenglicol 8 octadecil éter	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> OH	Brij <sup>®</sup> 78
Polietilenglicol 8 estearato	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> O (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> H	Myrj <sup>®</sup> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<b>Formulación</b>	<b>Tamaño inicial (nm)</b>	<b>Tamaño (1:1) (nm)</b>	<b>Tamaño (1:2) (nm)</b>
NP80	151,0 ± 4,5	473,8 ± 7,0	381,0 ± 14,4
NP80OA	134,9 ± 1,8	147,3 ± 1,9	137,5 ± 2,7
NP80CTAB	171,1 ± 1,1	202,2 ± 8,6	176,7 ± 4,1
NP80BZC	171,4 ± 3,5	176,6 ± 3,9	169,9 ± 2,5
NP20	133,9 ± 5,6	1721 ± 132	1125 ± 10
NP20OA	176,6 ± 7,4	3136 ± 1170	2905 ± 685
NP20CTAB	165,9 ± 3,7	359,8 ± 12,9	215,2 ± 6,8
NP20BZC	180,5 ± 6,2	239,3 ± 7,4	180,1 ± 2,7
NP85	136,2 ± 1,0	688,7 ± 30,4	614,3 ± 49,8
NP85OA	192,3 ± 0,4	219,0 ± 4,1	208,1 ± 2,0
NP40	125,5 ± 1,5	3181 ± 1933	8441 ± 483
NP40OA	1523 ± 65,7	1200 ± 212	1042 ± 44
NPcondroitina	142,9 ± 0,4	159,4 ± 2,3	143,2 ± 1,8

NPhialurónico	163,0 ± 0,1	312,2 ± 11,9	168,0 ± 2,2
NPpoliarginina	229,7 ± 0,6	1851 ± 69	927,2 ± 16,8

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

<b>Formulación</b>	<b>Tamaño inicial (nm)</b>	<b>Tamaño (1:1) (nm)</b>	<b>Tamaño (1:2) (nm)</b>
NP80	151,0 ± 4,5	8012 ± 1739	4739 ± 67
NP80OA	134,9 ± 1,8	143,7 ± 3,6	138,9 ± 5,9
NP80CTAB	171,1 ± 1,1	196,9 ± 3,6	220,7 ± 9,8
NP80BZC	171,4 ± 3,5	173,8 ± 3,0	178,0 ± 4,1
NP20	133,9 ± 5,6	3255 ± 533	1513 ± 106
NP20OA	176,6 ± 7,4	6266 ± 3164	3438 ± 910
NP20CTAB	165,9 ± 3,7	402,0 ± 15,1	274,9 ± 5,6
NP20BZC	180,5 ± 6,2	240,8 ± 6,0	137,8 ± 5,4
NP85	136,2 ± 1,0	235,1 ± 5,1	168,4 ± 5,2
NP85OA	192,3 ± 0,4	237,6 ± 3,6	236,6 ± 6,2
NP40	125,5 ± 1,5	4760 ± 983	2742 ± 1192
NP40OA	1523 ± 65	4965 ± 2465	3749 ± 921
NPcondroitina	142,9 ± 0,4	164,6 ± 1,9	154,6 ± 4,2
NPhialurónico	163,0 ± 0,1	243,0 ± 1,6	176,6 ± 7,2
NPpoliarginina	229,7 ± 0,6	1811 ± 83	526,5 ± 17,1

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

Ejemplo 13. Preparación de nanopartículas elaboradas a base de monolaurato de sorbitán (Span® 20) y asociación de una molécula antigénica como ingrediente activo para el desarrollo de una nanovacuna.

5 En el presente ejemplo se ha asociado la proteína rPorB a nanopartículas compuestas de ésteres de sorbitan para su uso como nanovacunas. Concretamente, los sistemas nanoparticulares elaborados a base de Span® 80 y con carga superficial positiva debido a la adición de OA fueron empleados para asociar dicha porina. Dicha porina fue amablemente cedida por los Profesores Criado y Ferreirós del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, en una concentración de 7 mg/ml en un medio Hepes pH 7,4 10 mM, 0,1% SDS, 10 0,02% Thiomersal. Para la asociación de la misma a las nanopartículas se diluyó en agua Milli-Q hasta una concentración de 1 mg/ml, y esta disolución se incorporó en un volumen de 200 microlitros a 200 microlitros de la suspensión de nanopartículas, manteniéndose el conjunto en un incubador a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los resultados de la caracterización de los sistemas fueron los siguientes: Tamaño:  $168,9 \pm 2,3$  nm y Potencial zeta:  $+54,5 \pm 2$  mV. La eficacia de asociación de la proteína se calculó indirectamente a partir de la proteína libre recuperada en el sobrenadante, una vez fueron centrifugadas las nanopartículas (14000 rpm, 120 min, 4°C). La 15 cantidad de proteína libre se determinó utilizando la técnica cuantitativa de BCA, obteniéndose un 97% de unión proteína-nanopartículas para la concentración de proteína de 1 mg/ml. Posteriormente se realizó un Dot Blott, técnica cualitativa que nos permite corroborar la unión proteína-nanopartículas, que de nuevo permitió confirmar dicha asociación nanopartículas-ingrediente 20 activo.

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%.
- 5 2. Nanopartícula según la reivindicación 2, caracterizada por ser una matriz sólida, homogénea, cuyo tamaño medio está comprendido entre 1 y 999 nm.
3. Nanopartícula, según las reivindicaciones 1 a 2, donde el tamaño promedio está comprendido entre 50 y 600 nm.
4. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuya carga varía entre  $-50$  mV y  $+60$  mV.
- 10 5. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el éster de sorbitán se selecciona de entre el grupo consistente en mono-, di-, tri- o sesqui-oleato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-laurato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-palmitato de sorbitán, mono-, di-, tri- o sesqui-estearato de sorbitán y mono-, di-, tri- o sesqui-isoestearato de sorbitán, y sus combinaciones.
- 15 6. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una sustancia catiónica, una sustancia aniónica, un derivado de óxido de etileno, o combinaciones de los mismos.
7. Nanopartícula según la reivindicación 6, donde la sustancia catiónica se selecciona entre sales de amonio, polímeros catiónicos y aminas grasas.
- 20 8. Nanopartícula según la reivindicación 7, donde el polímero catiónico se selecciona entre protamina, poliglutamato, dextrano cationizado, poliaminoácidos y proteínas cationizadas, y sus sales.
- 25 9. Nanopartícula según la reivindicación 6, donde la sustancia aniónica es un polímero aniónico seleccionado de entre el grupo constituido por ácido hialurónico, ácido colomínico, polisialico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furceleranos, alginatos, agar agar, glucomanano, goma gelano, goma garrofín, goma guar, goma tragacanto, goma arábica, goma xantano, goma karaya, pectinas, celulosas, almidones, sus sales, fragmentos, derivados o combinaciones de los mismos.
- 30 10. Nanopartícula según la reivindicación 6, donde el derivado de óxido de etileno se selecciona de entre polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), polietilenglicol hexadecil éter (Brij 56), polietilenglicol 2-octadecil éter (Brij 72), polietilenglicol 8-octadecil éter (Brij 78), polietilenglicol 8-estearato (Myrj 45), 2-hidroxiethyl octadecanoato (Myrj 52), monoestearato de etilen glicol, monoestearato de trietilen glicol.
- 35 11. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende un ingrediente activo.
12. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además comprende un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos.
- 40 13. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se encuentra en forma liofilizada.

14. Composición farmacéutica que comprende una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Composición cosmética que comprende una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12.
- 5 16. Composición nutricional que comprende una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12.
17. Producto sanitario que comprende una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12.
- 10 18. Sustancia para el recubrimiento de superficies que comprende una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12.
19. Uso de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12 en la preparación de un medicamento.
20. Uso de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12 en la preparación de un medicamento para terapia combinada.
- 15 21. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12 en la preparación de una vacuna.
22. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y terapia celular.
- 20 23. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, como marcador.
24. Uso de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para fines diagnósticos.
- 25 25. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para su administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, pulmonar, ótica, vaginal, intrauterina, rectal, entérica o parenteral.
26. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, en la preparación de un producto cosmético o de higiene personal para la administración sobre piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes o mucosas.
- 30 27. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para terapia génica, silenciamiento o interferencia genética, o vacunación genética.
28. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para producir la asociación, expansión o activación de poblaciones celulares o para manipular o alterar las características biológicas de células vivas tanto autólogas, como alogénicas, xenogénicas o de cultivos celulares y posteriormente emplear dichas células o grupos celulares para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico, preventivo o con fines regenerativos, o para modificar la producción de compuestos por dichas células, o para adaptarlas y asociarlas de modo efectivo a micropartículas o microcápsulas, matrices y andamiajes.
- 35 29. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para facilitar, estimular o modificar la producción de compuestos por células, con fin de producción biotecnológica.
- 40

30. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, con la finalidad de higiene o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado.
- 5 31. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para modificar, corregir o introducir propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad en un medicamento o en un producto cosmético o de higiene personal.
- 10 32. Uso de de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, para acondicionar, modificar o restablecer las características de agua, alimentos o suplementos nutricionales, así como para modificar, corregir o introducir nuevas propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad de los mismos y para facilitar o hacer posible la administración de alimentos o nutrientes a seres vivos.
33. Procedimiento para la preparación de una nanopartícula como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, que comprende las siguientes etapas:
- 15 a) preparar una fase orgánica que comprende un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%;
- b) mezclar bajo agitación la disolución obtenida en a) con una disolución acuosa.
34. Procedimiento según la reivindicación 33, donde la fase orgánica de la etapa a) y/o la disolución acuosa de la etapa b) además comprende una sustancia catiónica, una sustancia aniónica o ambas.
- 20 35. Procedimiento según las reivindicaciones 33 a 34, que comprende además una etapa c) que comprende la incubación de la dispersión de nanopartículas formadas en la etapa b) con una disolución que comprende una sustancia catiónica, un polímero aniónico o una combinación de ambos.
- 25 36. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 33 a 35, donde la fase orgánica de la etapa a) comprende además un derivado de óxido de etileno.
37. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 33 a 36, donde el disolvente de la fase orgánica es un solvente hidromiscible.
38. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 33 a 37, donde el éster de sorbitán se disuelve en la fase orgánica en una concentración de entre 0,1 y 10 mg/ml.
- 30 39. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 34 a 35, donde la sustancia catiónica, aniónica o ambas, se disuelven a una concentración de entre 0,01 y 1,0 mg/mL.
- 35 40. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 33 a 39, que comprende además la adición de un ingrediente activo, y/o un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos, en una de las disoluciones a) o b) dependiendo de su carácter lipofílico o hidrofílico.
- 40 41. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 33 a 39 que comprende además la adición de un ingrediente activo, y/o un compuesto seleccionado de entre un marcador, un adyuvante, un inmunomodulador, un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie, un compuesto estabilizante, un compuesto sensible a la polimerización química o combinaciones de los mismos, en una etapa c) posterior a la etapa b).

42. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 33 a 41, que comprende una etapa adicional después de la etapa b) o de la etapa c) en la que las nanopartículas se someten a un proceso de deshidratación total o parcial.
43. Procedimiento según la reivindicación 42, que comprende una etapa adicional en la que se regeneran las nanopartículas deshidratadas parcialmente o liofilizadas.
- 5



Figura 1

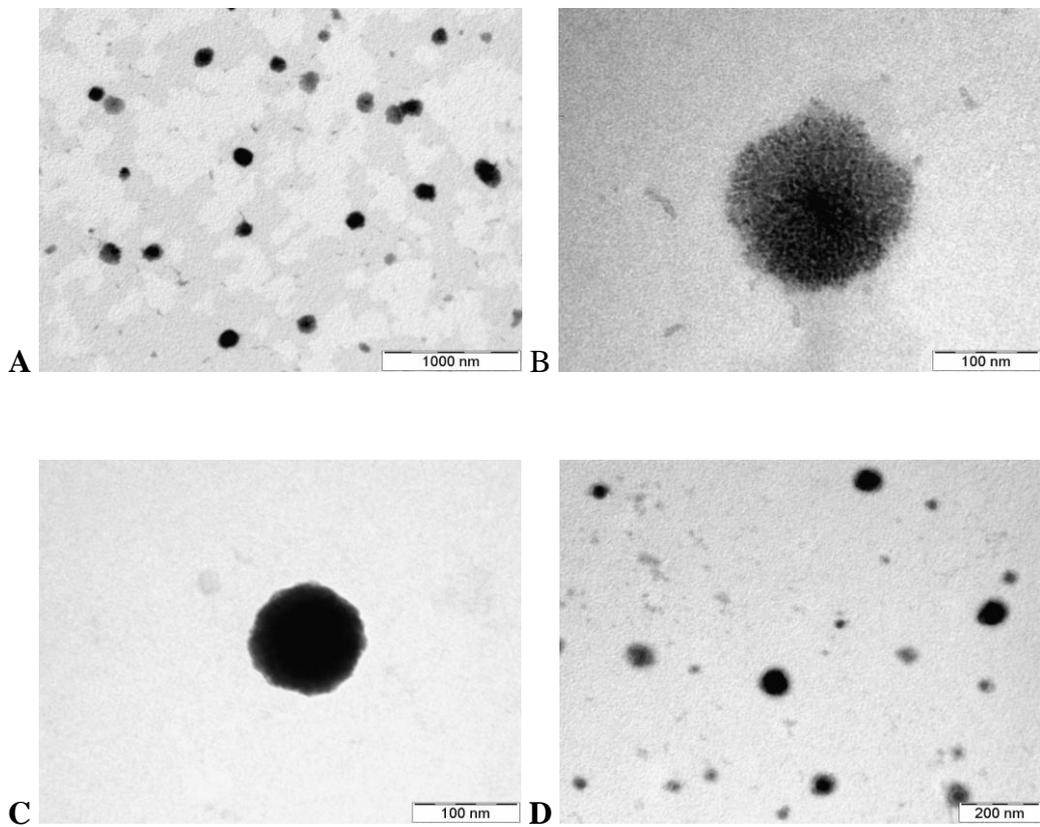


Figura 2

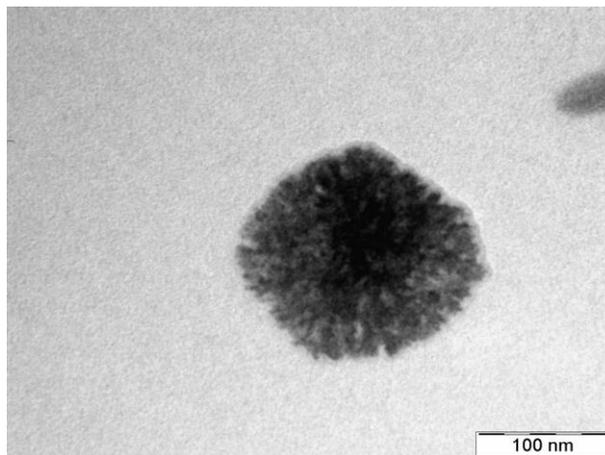
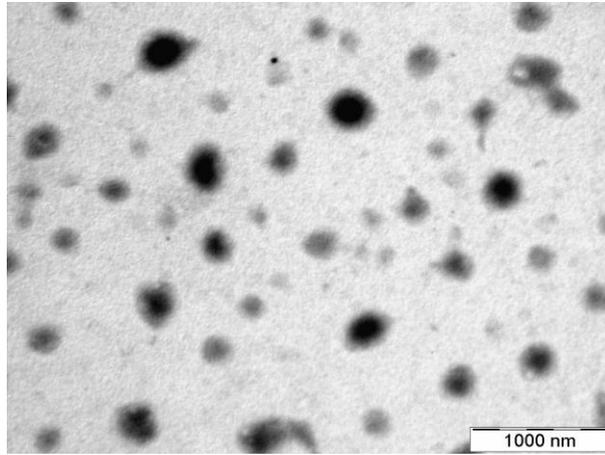


Figura 3

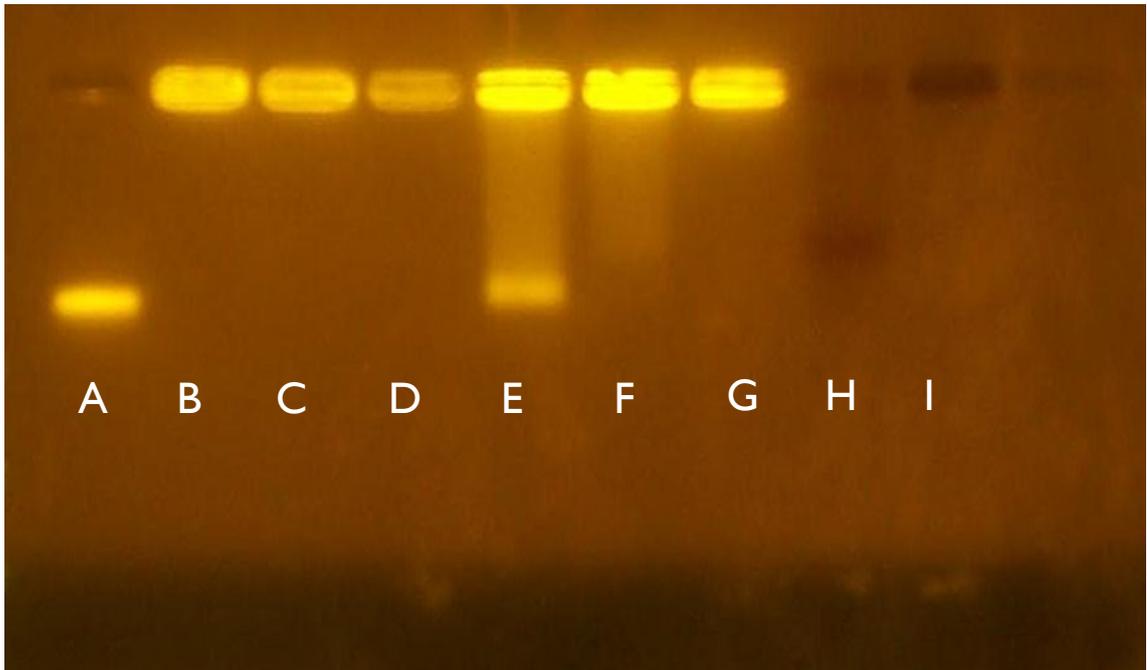


Figura 4

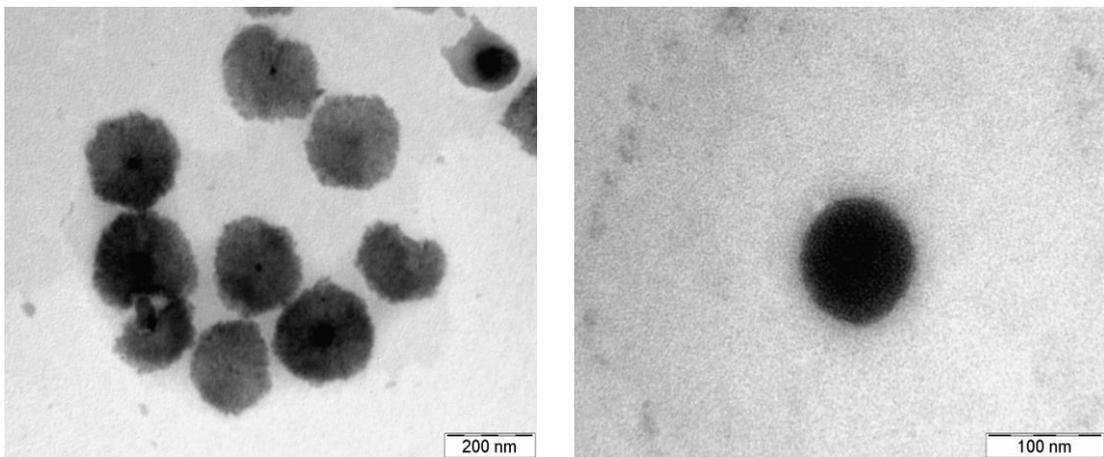


Figura 5

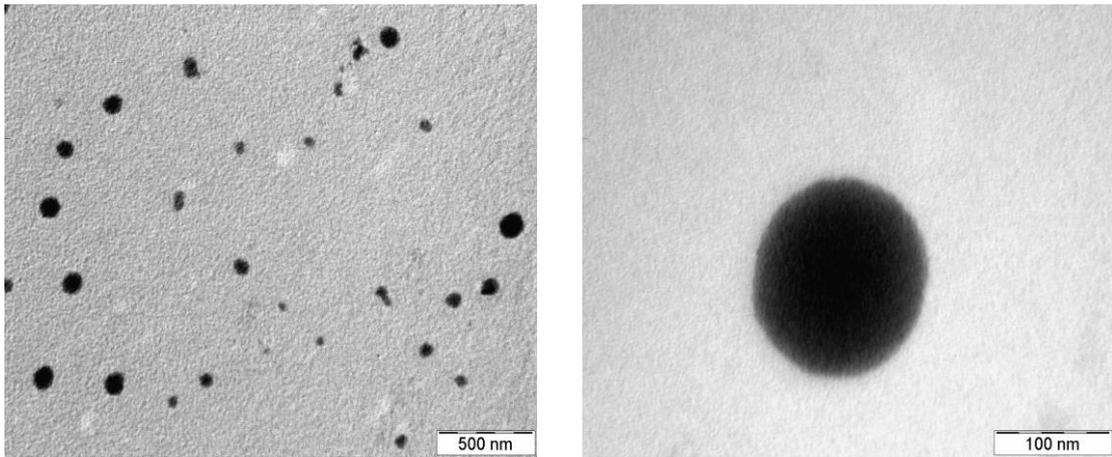


Figura 6

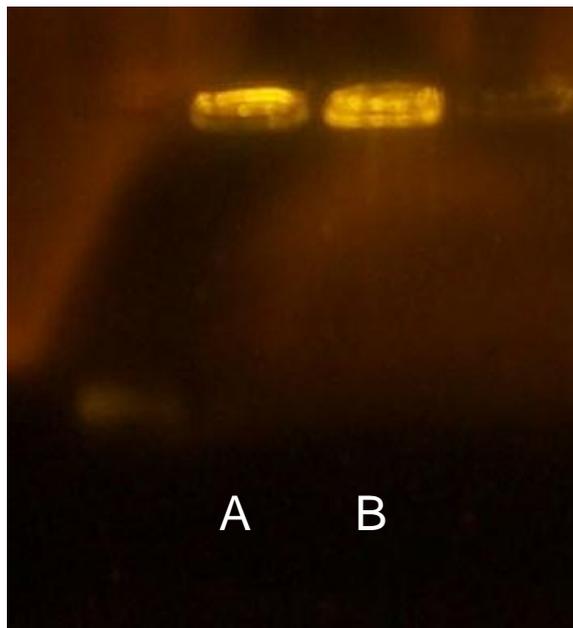


Figura 7

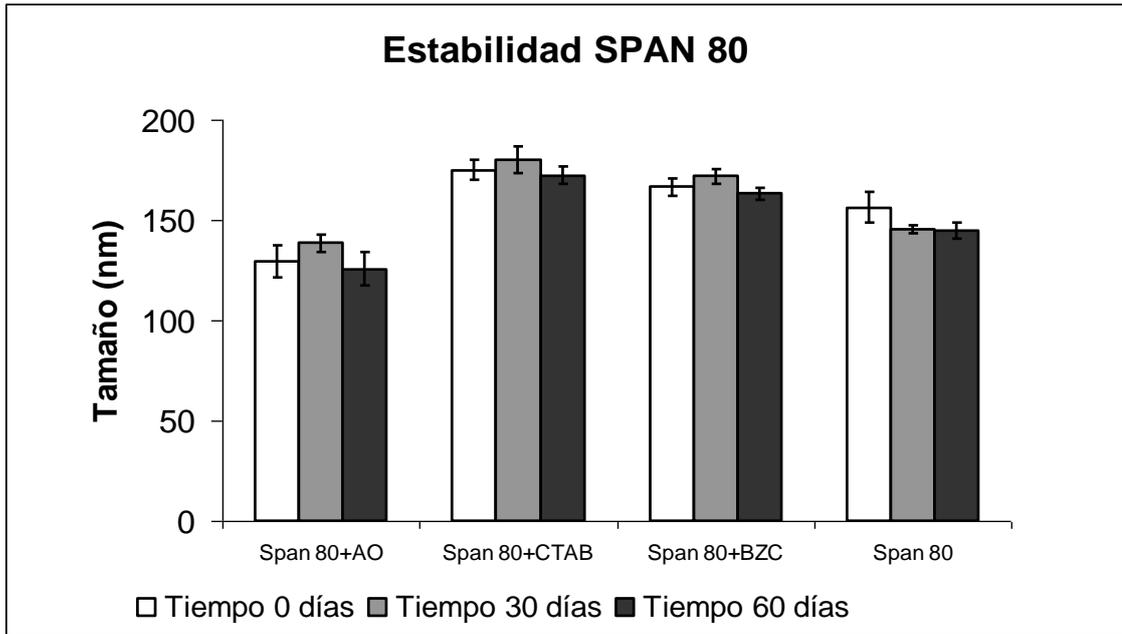


Figura 8

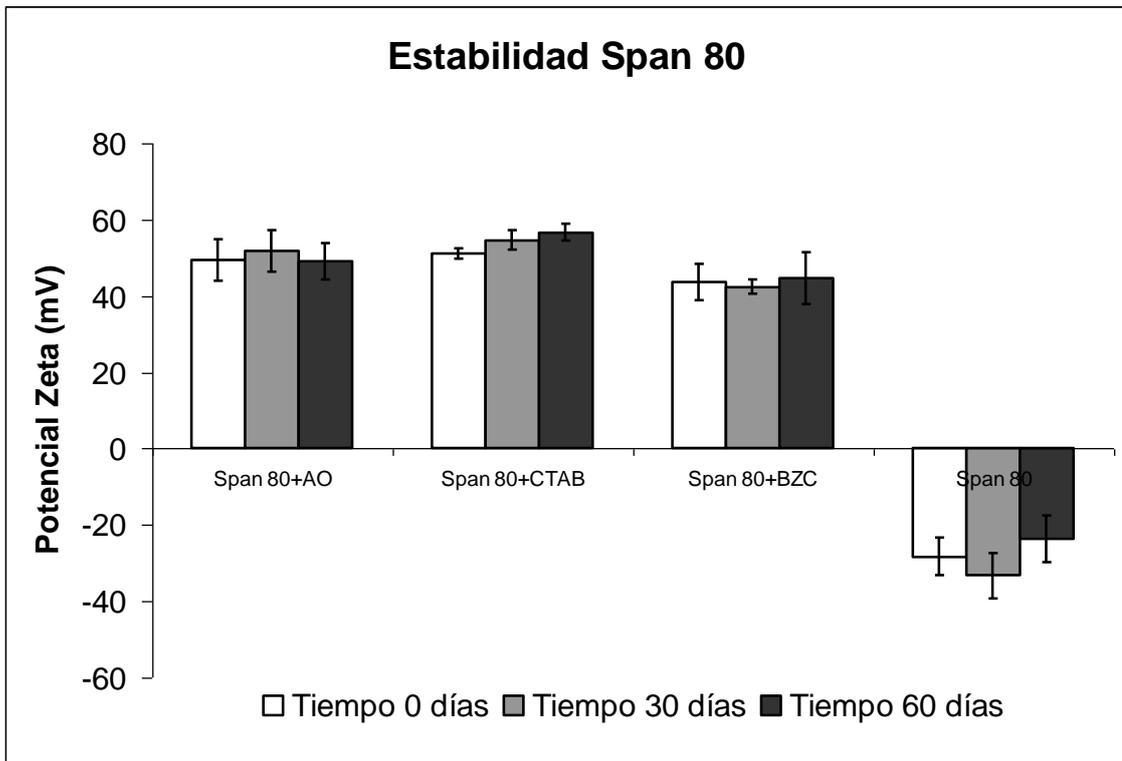


Figura 9

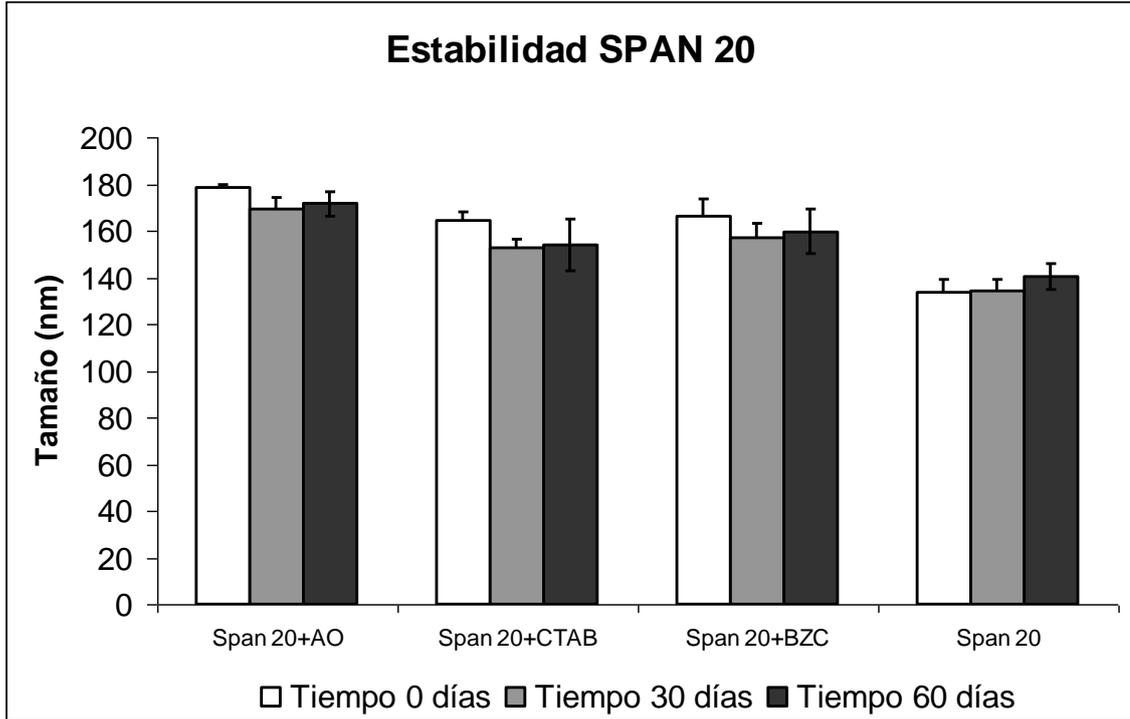


Figura 10

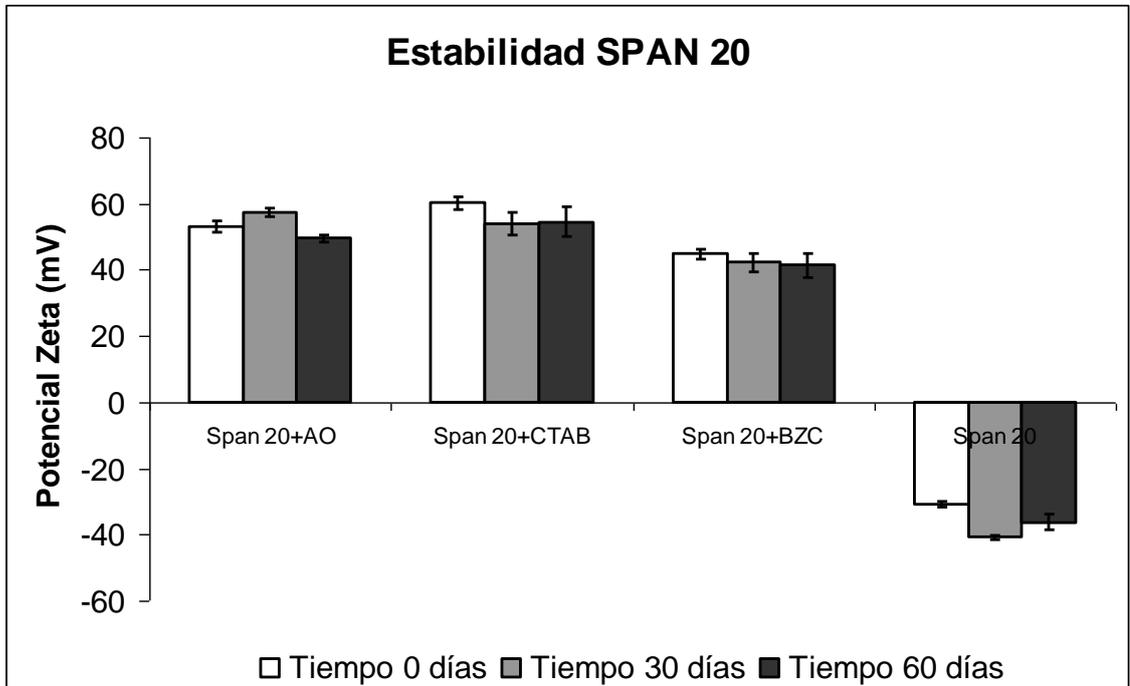


Figura 11



A



B

Figura 12



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131812

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PODCZECK, F. et al.; The preparation of pellets containing non-ionic surfactants by extrusión/spheronization; International Journal of Pharmaceutics 361 (2008) 33-40.	1-43
A	MURDAN, SUDAXSHINA et al.; Novel gels and their dispersions – oral drug delivery systems for ciclosporin; International Journal of Pharmaceutics 300 (2005) 113-124.	1-43
A	KAKKAR, SHILPA, et al.; Spanlastics - A novel nanovesicular carrier system for ocular delivery; International Journal of Pharmaceutics 413, 15 julio 2011, páginas 202-210.	1-43
A	MURDAN, SUDAXSHINA et al.; Novel sorbitan monostearate organo gels; Journal of Pharmaceutical Sciences, volumen 88, nº 6, junio 1999, páginas 608-614.	1-43

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
09.08.2012

Examinador  
N. Vera Gutierrez

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K9/51** (2006.01)

**A61K47/14** (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, WPI, CAS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.08.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-43	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-43	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	PODCZECK, F. et al.; The preparation of pellets containing non-ionic surfactants by extrusión/spheronization; International Journal of Pharmaceutics 361 (2008) 33-40.	2008
D02	MURDAN, SUDAXSHINA et al.; Novel gels and their dispersions – oral drug delivery systems for ciclosporin; International Journal of Pharmaceutics 300 (2005) 113-124.	2005

**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 nanopartículas que comprenden un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%, a las composiciones que las contienen, así como a su uso y su procedimiento de obtención.

El documento D01 divulga la preparación de pellets que contienen surfactantes no iónicos por el procedimiento de extrusión/esferonización. Se utilizan monoestearato de sorbitán y monooleato de sorbitán como surfactantes, en un rango de concentraciones entre 5% y 95%. La cantidad máxima de surfactante que se ha podido incorporar en los pellets finales es aproximadamente 22,5%.

En el documento D02 se describen geles como sistemas para la liberación oral de ciclosporina. En el apartado 2.2 se prepara una formulación A a partir de monoestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, polisorbato 20 y ciclosporina.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que divulguen nanopartículas que comprendan un éster de sorbitán en una proporción en peso de entre 60% y 100%.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-43 de la solicitud son nuevas e implican actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).