

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 940**

21 Número de solicitud: 201231956

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51**

(2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**17.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**31.07.2014**

Fecha de la concesión:

**28.04.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**06.05.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070885**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Edificio EMPRENDIA-Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**ALONSO FERNÁNDEZ, María José;  
CSABA, Noemi y  
GONZÁLEZ ARAMUNDIZ, José Vicente**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **NANOCÁPSULAS DE PROTAMINA**

57 Resumen:

Nanocápsulas de protamina.

La presente invención se dirige al diseño y desarrollo de sistemas de nanocápsulas para la administración de principios activos, en donde las nanocápsulas del sistema tienen un diámetro medio inferior a 1  $\mu\text{m}$  y se caracterizan por comprender (a) una cubierta de protamina (b) un núcleo oleoso y uno o más tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8, con la condición de que dicho tensoactivo no es un fosfolípido.

ES 2 481 940 B1

ES 2 481 940 B1  
**DESCRIPCIÓN**  
**NANOCÁPSULAS DE PROTAMINA**

**Campo de la técnica**

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

**Antecedentes de la invención**

La incorporación de ingredientes activos en sistemas de tamaño nanométrico ha ayudado a solventar las limitaciones de formulación que presentan estas moléculas, incrementando adicionalmente su potencial en terapéutica. Mejoras en la solubilidad, protección frente a la degradación o mayor penetración de los ingredientes activos son algunas de las ventajas que ofrecen la nanoencapsulación de moléculas activas o la adsorción de estas mismas en la cubierta polimérica. Asimismo, es también conocido que la capacidad de estos sistemas para atravesar las barreras externas y acceder al interior del organismo depende tanto de su tamaño como de su composición. Partículas de pequeño tamaño aumentarán el grado de transporte respecto a las de un mayor tamaño: los nanosistemas, de diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , responden a este criterio.

Además, es posible recubrir estas nanocápsulas con materiales poliméricos. Así un posible material polimérico es la protamina, la cual pertenece a una familia de polipéptidos naturales, ricos en arginina que se sintetizan en la última etapa de espermatida de muchos animales y plantas, en el proceso de la espermatogénesis. Si bien su estudio comienza en el año 1868 por Friedrich Miescher, muchos son los trabajos que se han realizados para caracterizar a este conjunto de péptidos alifáticos, fuertemente básicos, de peso molecular aproximado entre los 4000 – 10000 Da.

La Protamina ha sido aprobada como excipiente farmacéutico y su principal aplicación hoy en día, se encuentra en la formulación de liberación sostenida de insulina: NPH (del inglés: Neutral Protamine Hagedorn), aparte de tener registro sanitario como principio activo por ser el antídoto para intoxicaciones por heparina.

Muchos y diversos son los estudios en los que se han utilizado este excipiente principalmente en combinación con liposomas para la liberación de DNA al interior de las células (Gene Ther. 1997. 4, 961–968), conjugadas con algún oligonucleótido; nanopartículas llamadas proticles (Nucleic Acids Res. 2000. 15;28(10):E45.), para la liberación de péptido intestinal vasoactivo (J Control Release. 2008. 10;130(2):192-8), aprovechando su supuesta actividad antimicrobiana (J Antimicrob Chemother. 2008 Mar;61(3):651-7), entre otras.

En los estudios mencionados anteriormente, por su actividad intrínseca, la protamina ha sido ampliamente utilizada e investigada para formar complejos con material genético mediante interacciones electrostáticas entre su elevada carga positiva, dada por los grupos argininas que interaccionan con los grupos aniónicos de los ácidos nucleicos; por ende es capaz de unir y precipitar el DNA dentro de las estructuras que sirven como vehículos en su administración. También se ha demostrado la actividad adyuvante de este polipéptido, incrementando la secreción de interleukina 2 e interferón gama, así como la proliferación de células T (J Control Release. 2008; 10;130(2):161-7).

No obstante se hace imposible su utilización en la formulación de nanocápsulas de protamina conteniendo un núcleo oleoso, ya que este polipéptido desestabiliza las emulsiones aceite/agua. Teniendo esto en consideración se hace necesario diseñar nuevos sistemas nanocapsulares que no sean desestabilizados por la protamina y se beneficien de sus propiedades.

### **Breve descripción de la invención**

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema nanocapsular que incorpora protamina y no se desestabiliza por su presencia. Este sistema nanocapsular es estable, fácil de obtener y además permite asociar eficazmente ingredientes activos de diferente naturaleza, tanto hidrofílicos como lipofílicos. El tamaño reducido de dichas nanocápsulas (diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ ) y la carga superficial positiva de protamina, permite la interacción con superficies biológicas del organismo cargadas negativamente, como lo son las mucosas y posibilita su paso a través de estas y que sean internalizadas por las células. Asimismo, la presencia de una cubierta polimérica le confiere mayor estabilidad a las nanocápsulas y le proporciona características beneficiosas propias de la protamina.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un sistema nanocapsular (de aquí en adelante “sistema nanocapsular de la invención”) adecuado para la administración de principios activos, donde las nanocápsulas del sistema comprenden:

- a. Una capa superficial constituida por el polipéptido protamina ó que comprende el polipéptido protamina;
  - b. Un núcleo oleoso;
  - c. Un tensoactivo caracterizado por tener una relación hidrofílica-lipofílica (balance hidrófilico-lipofílico (HLB)) superior a 8; y
  - d. opcionalmente al menos un principio activo,
- con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido.

Ejemplos de tensoactivos adecuados para poner en práctica la presente invención son: monooleato de sorbitán poli oxietilénico (Tween 80®), monoláurato de sorbitan poli oxietilénico (Tween 20®), monoestearato de polioxietilensorbitano (Tween 61®), monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 81®), triestearato de polioxietilensorbitano (Tween 65®), trioleato de polioxietilensorbitano (Tween 85®), monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 21®), monoestearato de polietilenglicol, estearato de polietilenglicol, dilaurato de polietilenglicol, monopalmitato de polietilenglicol, polietilenglicol estearato, Poloxamer 124, Poloxamer 188, Poloxamer 237, Poloxamer 338, Poloxamer 407, Solutol HS15 ®, TPGS, oleato de trietanolamonio, oleato sódico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, lauril sulfato sódico, oleato de irietanolamina, goma tragacanto y dodecilsulfato sódico ó cualquier combinación de los tensoactivos citados. Preferentemente el tensoactivo se selecciona de la lista que consiste en colato de sodio, polietilenglicol estearato, Solutol HS15 ®, TPGS, monooleato de sorbitán poli oxietilénico (Tween 80®) y monoláurato de sorbitan poli oxietilénico (Tween 20®) ó cualquier combinación de estos tensoactivos.

Ejemplos de componentes del núcleo oleoso adecuados para poner en práctica la presente invención son: aceite de cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma,  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol® y Maisine® o cualquier combinación de estos aceites. Preferentemente el núcleo lipófilo oleoso se selecciona de la lista que consiste en Miglyol®, escualeno ó  $\alpha$  tocoferol ó cualquiera de sus combinaciones.

En una realización particular del primer aspecto de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende:

- a. Una capa superficial constituida por el polipéptido protamina ó que comprende el polipéptido protamina;
- 5 b. Un núcleo oleoso seleccionado de la lista que consiste en Miglyol®, escualeno ó  $\alpha$  tocoferol o cualquiera de sus combinaciones;
- c. Un tensoactivo caracterizado por tener una relación hidrofílica-lipofílica (balance hidrófilico-lipofílico (HLB)) superior a 8, seleccionado de la lista que consiste en colato de sodio, polietilenglicol estearato, Solutol HS15 ®, TPGS, monooleato de
- 10 sorbitán poli oxietilénico (Tween 80®) y monoláurato de sorbitan poli oxietilénico (Tween 20®) ó cualquiera de sus combinaciones; y
- d. opcionalmente al menos un principio activo.

En otra realización del primer aspecto de presente invención el sistema nanocapsular de la invención se caracteriza por estar liofilizado.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener el sistema nanocapsular de la invención (de aquí en adelante “procedimiento de obtención de la invención”). Así, para lograr la formación de nanocápsulas en un rango de tamaños deseado,

20 se procede a la formación de los núcleos oleosos que comprenden un aceite y uno o más tensoactivos, en cuya superficie se une el polímero de recubrimiento a través de diferentes tipos de interacción. Se trata, por tanto, de un proceso de difusión de solventes, que ocurre de manera controlada y proporciona estabilidad al sistema, sin que exista la necesidad de crear enlaces covalentes entre los componentes.

25 Por tanto, en una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el procedimiento de obtención de la invención es un procedimiento de difusión de disolvente en una etapa que comprende los siguientes pasos:

- a. preparar una disolución acuosa que comprende protamina;
- 30 b. preparar una disolución orgánica que comprende los componentes del núcleo oleoso y uno o más tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8;
- c. mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b) para obtener las nanocápsulas; y

d. opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido.

5 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, el procedimiento de obtención de la invención es un procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas que comprende los siguientes pasos:

10 a. preparar una disolución orgánica que comprende los componentes del núcleo oleoso y uno o más tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8;

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

15 c. opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante; y

d. recubrir la nanoemulsión obtenida en la etapa anterior mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa que comprenda protamina, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido.

20 En el supuesto que el sistema nanocapsular de la invención comprendiese un principio activo el procedimiento de la invención incluiría la adición de éste a la disolución orgánica si es éste tiene carácter lipófilo ó a la disolución acuosa si éste tiene carácter hidrófilo.

25 Un tercer aspecto de la presente invención, se refiere al sistema nanocapsular de la invención para su uso en terapia.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende como principio activo docetaxel y se usa para el tratamiento del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón o páncreas.

30 En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende como principio activo el antígeno recombinante de la hepatitis B (rHBsAg) y se usa para el tratamiento o prevención de la hepatitis B.

En aún otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende como principio activo el antígeno recombinante de la influenza H1N1 (HI) y se usa para el tratamiento o prevención de la influenza del tipo H1N1.

- 5 Un cuarto aspecto de la invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende el sistema nanocapsular de la invención y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 10 **Figura 1:** Viabilidad de la línea celular de cáncer A549 tras 24 y 48 horas de contacto con nanocápsulas de protamina cargadas con DCX, nanocápsulas blancas de protamina, disolución de DCX en etanol y etanol.

- Figura 2:** Viabilidad de la línea celular de cáncer H460 tras 24 y 48 horas de contacto con nanocápsulas de protamina cargadas con DCX, nanocápsulas blancas de protamina,  
15 disolución de DCX en etanol y etanol.

**Figura 3:** Viabilidad de la línea celular de cáncer MiaPaCa 2 tras 24 y 48 horas de contacto con nanocápsulas de protamina cargadas con DCX, nanocápsulas blancas de protamina, disolución de DCX en etanol y etanol.

- Figura 4:** Viabilidad de la línea celular de cáncer BxPC3 tras 24 y 48 horas de contacto con  
20 nanocápsulas de protamina cargadas con DCX, nanocápsulas blancas de protamina, disolución de DCX en etanol y etanol.

- Figura 5:** Niveles de anticuerpo IgG en sangre de ratón tras la administración de nanocápsulas de protamina con aceite escualeno (SQL) y  $\alpha$  tocoferol (TCPH) cargadas con el antígeno de la hepatitis B (10  $\mu$ g) por vía nasal ( 3 dosis), intramuscular (2 dosis), y un  
25 calendario combinado (1 dosis intramuscular y 2 nasal); comparados con el antígeno adsorbido en hidróxido de aluminio administrado por vía intramuscular(2 dosis).

**Figura 6:** Niveles de absorbancia producido por los anticuerpos IgG en sangre de ratón tras la administración de nanocápsulas de protamina con núcleo de  $\alpha$  tocoferol (TCPH) cargadas con el antígeno de la influenza en dosis de 2 y 7,5  $\mu$ g, por vía subcutánea.

- 30 **Figura 7:** Wesern blot del antígeno recombinante de la hepatitis B adsorbido en las nanocápsulas de protamina tras el proceso de liofilización.

**Figura 8:** Viabilidad de la línea celular de macrófagos RAW 264,7 tras 24 y 48 horas de contacto con nanocápsulas de protamina y núcleo de escualeno (SQL) o  $\alpha$  tocoferol (TCPH).

**Figura 9:** Imágenes de microscopia electrónica de transmisión (TEM) de nanocápsulas de protamina preparadas con la combinación de tensoactivos PEG estearato/colato de sodio y aceite Miglyol®.

**Figura 10:** Imágenes de microscopia confocal de nanocápsulas de protamina preparadas con el tensoactivo PEG estearato/colato de sodio y aceite  $\alpha$  tocoferol. Como molécula activa están cargadas con el antígeno de la influenza (H1N1).

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se dirige al diseño y desarrollo de sistemas de nanocápsulas para la administración de principios activos, en donde las nanocápsulas del sistema tienen un diámetro medio inferior a 1  $\mu\text{m}$  y se caracterizan por comprender (a) una cubierta de protamina (b) un núcleo oleoso y uno o más tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8, con la condición de que dicho tensoactivo no es un fosfolípido.

Resulta conocido que la protamina desestabiliza las emulsiones aceite/agua. De hecho, ni siquiera la utilización de tensoactivos tales como lipoproteínas u otros que posean estructura fosfolipídica, como lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son capaces de lograr estabilizar dichas emulsiones aceite/agua en las que la protamina está presente. Este hecho se confirma en el ejemplo 1 de la presente invención donde los autores han intentado la formación de sistemas de nanocápsulas con un diámetro medio inferior a 1  $\mu\text{m}$  caracterizadas por comprender (a) una cubierta de protamina y (b) un núcleo oleoso utilizando como tensoactivos fosfolípidos como la lecitina, lecitinas modificadas o la lisofosfatidilcolina sin éxito.

Por lo tanto se hace imposible la utilización de la protamina en este tipo de formulaciones. Por ello y con el objeto de solventar este problema los autores de la presente invención han diseñado nuevos sistemas nanocapsulares que no sean desestabilizados por la protamina y se beneficien de sus propiedades.



En este sentido, los autores de la presente invención han descubierto como a través de la utilización de ciertos tipos de tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica (balance hidrófilico-lipofílico (HLB)) superior a 8, preferentemente superior a 12, se puede observar la obtención de sistemas nanocápsulares de protamina caracterizadas por comprender (a) una cubierta de protamina y (b) un núcleo oleoso. Así, en los ejemplos 2.1 a 2.18 se ilustra como con diferentes surfactantes, núcleos oleosos y métodos de preparación se pueden obtener este tipo de sistemas, siempre y cuando los tensoactivos utilizados estén caracterizados por tener un  $HLB > 8$  y no sean fosfolípidos. Asimismo, estos ejemplos demuestran la versatilidad del sistema respecto a sus características fisicoquímicas.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un sistema nanocapsular ("sistema nanocápsular de la invención) adecuado para la administración de principios activos, que comprende:

- a. Una capa superficial constituida por el polipéptido protamina ó que comprende el polipéptido protamina;
- b. Un núcleo oleoso;
- c. Un tensoactivo caracterizado por tener una relación hidrofílica-lipofílica (balance hidrófilico-lipofílico (HLB)) superior a 8; y
- d. opcionalmente al menos un principio activo, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido.

La ventaja de este sistema concreto de nanocápsulas con respecto a otros sistemas conocidos ya sean nanocapsulares o de nanoemulsiones es la presencia del polipéptido protamina en la cubierta. Este polipéptido brinda, entre otras propiedades, estabilidad a la nanocápsula así como protección, capacidad de penetración y especificidad en su interacción con determinadas células diana. La presencia de protamina en la superficie de las nanocápsulas además brinda una mayor respuesta por parte de las células inmunes por tener una comprobada actividad adyuvante. La protamina es un compuesto natural, lo que presenta ventajas frente a otros polímeros con alto contenido de argininas como por ejemplo la poliarginina que es una molécula sintética. De este modo, la presencia de protamina permite que las nanocápsulas de la invención sean un vehículo seguro capaz de metabolizarse y excretarse rápidamente evitando así llegar a concentraciones tóxicas y acumulación en el organismo. Además, para las nanocápsulas de la invención con cubierta de protamina no es

necesario un crioprotector para la liofilización ni elevadas diluciones para evitar agregaciones indeseadas.

5 Adicionalmente, se hace notar que en el contexto de la presente invención el término protamina incluye las sales solubles en agua de protamina así como derivados hidrosolubles de protamina.

10 Además, en comparación con otros sistemas como los liposomas o las nanopartículas, que generalmente se ven condicionadas a una limitada carga de fármaco, las nanocápsulas de la presente invención poseen una mayor posibilidad de carga, en particular de fármacos lipofílicos, debido a la presencia del núcleo oleoso. Otra de las grandes ventajas de las nanocápsulas de la presente invención es la capacidad de combinar fármacos de diferente naturaleza, pudiendo estar un fármaco lipofílico encapsulado en el núcleo y un fármaco hidrofílico asociado a la cubierta; asimismo, la cubierta les brinda estabilidad, protección y  
15 especificidad.

Estos sistemas presentan además ventajas respecto a otros de mayor tamaño (micropartículas, pellets, films, esponjas...) en cuanto a sus aplicaciones biológicas. De hecho, se sabe que la interacción de un sistema de liberación de fármacos con una superficie biológica está  
20 altamente condicionada por su tamaño. Así, las nanocápsulas son capaces de atravesar mucosas y de ser internalizadas por las células actuando como sistemas de transporte de fármacos, mientras que las micropartículas no tienen esa capacidad. Igualmente, la biodistribución de estos sistemas está altamente condicionada por el tamaño. El conocimiento generado en los últimos años en el mundo de la nanomedicina y los nanosistemas de  
25 liberación de fármacos ha permitido fijar una frontera claramente definida entre los sistemas nanométricos (que poseen un tamaño inferior a una micra ej. nanopartículas y nanocápsulas) y los sistemas micrométricos (micropartículas y microcápsulas). Además de las diferencias de comportamiento en cuanto a su capacidad para ser internalizados por las células y superar complejas barreras biológicas, en el caso de las formulaciones destinadas a la administración  
30 intravenosa de fármacos antitumorales es imprescindible el tamaño nanométrico de los sistemas de liberación a fin de prevenir la obstrucción de los capilares sanguíneos. Asimismo, se sabe que las posibilidades de los nanosistemas para alcanzar el tejido tumoral están estrictamente relacionadas con su tamaño y también por el carácter hidrofílico de su superficie.

Asimismo, es importante destacar la diferencia entre los sistemas de nanocápsulas y los “complejos”. Se entiende por “complejos” la nanoestructura formada por la interacción de polielectrolitos o bien por polielectrolitos y tensoactivos de carga opuesta. Los sistemas de nanocápsulas de la presente invención se diferencian de los complejos por tratarse de un sistema transportador nanocapsular, tipo reservorio, en cuyo núcleo se pueden alojar un importante número de moléculas que tengan una mayor o menor afinidad por el núcleo oleoso (encapsulación) y en cuya cubierta pueden incorporarse moléculas hidrofílicas que tengan una cierta afinidad por la misma (adsorción). Estas características permiten mantener la integridad y funcionalidad de la nanoestructura, así como aportar mayor estabilidad en presencia de fluidos biológicos.

Así, el sistema nanocapsular de la invención presentan ventajas en comparación con otros sistemas de administración y/o liberación de fármacos, debido a su comportamiento singular en cuanto a:

- la encapsulación/asociación de principios activos: el sistema puede incluir uno o más principios activos o sustancias adyuvantes, hidrofílicos o lipofílicos, en proporciones superiores a la de las nanopartículas, micelas, complejos, nanogeles.
- la liberación del principio activo: la cubierta ejerce una función en la velocidad de liberación del mismo, permitiendo liberar de forma controlada el principio activo según aplicación y necesidades.
- la estabilidad en fluidos biológicos: la cubierta polimérica confiere a los núcleos oleosos una gran estabilidad, lo que representa una ventaja frente a otros sistemas de micro y nanoemulsiones.
- la interacción específica con determinados superficies biológicas: la cubierta polimérica confiere a los núcleos oleosos la posibilidad de interaccionar con superficies mucosas así como con epitelios y células específicas.
- la rápida metabolización y excreción de la protamina, confiere a este sistema un perfil de seguridad farmacocinético, no pudiéndose demostrar el mismo perfil para otros sistemas nanocapsulares con otra tipo de cubierta, como el de poliarginina.
- la estabilidad durante la liofilización, no es necesario en las nanocápsulas de la invención crioprotectores para ese proceso, ni elevadas diluciones para evitar agregaciones indeseadas.

Las nanocápsulas del sistema de la presente invención presentan un diámetro medio inferior a 1  $\mu\text{m}$ , respondiendo por tanto a la definición de nanosistema, sistema coloidal constituido a base de polímeros con un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , es decir, tienen un tamaño de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 30 y 500 nm. Se entiende por diámetro medio aquel medido mediante la técnica Dynamic Light Scattering (DLS) que está definido por el diámetro hidrodinámico de una esfera que difunde a la misma velocidad que las partículas que se están midiendo. El tamaño de las nanocápsulas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación y puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica y que se describen en el apartado de ejemplos. En este sentido, tal y como se puede comprobar el tamaño de las mismas no varía notoriamente al modificar la relación de compuesto de cubierta en la formulación, obteniéndose en todos los casos sistemas de tamaño nanométrico.

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

Por otro lado, como ya se ha comentado, el sistema nanocapsular de la presente invención comprende al menos un tensoactivo. En la presente invención, el término “tensoactivo” alude a un componente que posee estructuras y/o grupos funcionales que les permiten interaccionar simultáneamente con la parte lipófila e hidrófila de la formulación. Para preparar el sistema nanocapsular de la invención resulta necesario tener en consideración el HLB del tensoactivo a utilizar. El concepto HLB se basa en un método experimental que consiste en atribuir un cierto número HLB a los agentes emulsionantes a partir de datos relativos a la estabilidad de una emulsión. Este número HLB representa implícitamente varios parámetros y da cuenta del balance hidrofílico-lipofílico del sistema. El método para calcular el HLB como se define en la presente invención se basa en los grupos funcionales de la molécula estudiada, teniendo en cuenta la fuerza de los grupos hidrofílicos, se calcula de la siguiente manera:

$$HLB = 7 + m * Hh - n * Hl$$

Donde  $m$  es el número de grupos hidrofílicos,  $Hh$  el valor de los grupos hidrofílicos,  $n$  el número de grupos lipofílicos y  $Hl$  su valor (Davies, J. T. (1957) "A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent. Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces". Proceedings of 2nd International Congress Surface Activity, Butterworths, London, pp. 426-38).

Ejemplos de tensoactivos adecuados para llevar a cabo la presente invención se seleccionan de entre ésteres de sorbitan etoxilados y ésteres de ácidos grasos. En una realización particular, los ésteres de sorbitán se seleccionan de entre monooleato de sorbitán poli oxietilénico (Tween 80®), monoláurato de sorbitan poli oxietilénico (Tween 20®), monoestearato de polioxietilensorbitano (Tween 61®), monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 81®), triestearato de polioxietilensorbitano (Tween 65®), trioleato de polioxietilensorbitano (Tween 85®) y monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 21®). En otra realización particular, los ésteres de ácidos grasos se seleccionan de entre monoestearato de polietilenglicol, estearato de polietilenglicol, dilaurato de polietilenglicol, monopalmitato de polietilenglicol, polietilenglicol estearato, Poloxamer 124, Poloxamer 188, Poloxamer 237, Poloxamer 338, Poloxamer 407, Solutol HS15®, TPGS. En otra realización particular, el tensoactivo se selecciona de entre el grupo constituido por oleato de trietanolamonio, oleato sódico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, lauril sulfato sódico, oleato de irietanolamina, goma tragacanto y dodecilsulfato sódico. En aún otra realización particular el tensoactivo es colato de sodio, estearato de polietilenglicol, TPGS, Solutol HS15®, Tween 20, Tween 80 o combinaciones de los mismos.

Adicionalmente, el sistema nanocapsular de la presente invención se caracteriza por tener un núcleo oleoso constituido, entre otros componentes, a base de aceites volátiles o no volátiles. En el contexto de la presente invención se entiende por núcleo oleoso el que constituye la estructura interna de las nanocápsulas de la invención y está compuesto por al menos un aceite y al menos un tensoactivo como se ha descrito anteriormente. Estos aceites se pueden seleccionar entre aceites naturales, semisintéticos y sintéticos de uso farmacéutico tales como aceites de origen animal, vegetal, aceites hidrocarbonados o aceites de silicona. Aceites adecuados para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, aceite de escualeno, aceites de sabor, aceite de silicona, aceites esenciales, vitaminas insolubles en agua, isopropil estearato, butil estearato, octil palmitato, cetil palmitato, tridecil behenato, diisopropil adipato, dioctil sebacato, mentil antranilato, cetil octanoato, octil

salicilato, isopropil miristato, cetoles de dicarpato de neopentilglicol, Cerafilos®, decil oleato, C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> alquil lactatos, cetil lactato, lauril lactato, isostearil neopentanoato, miristil lactato, isocetil estearoil estearato, octildodecil estearoil estearato, aceites de hidrocarburos, isoparafina, parafinas fluidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de colza, aceite de

5 chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de lino, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palma fraccionado, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de semilla de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de salvado de arroz, cártamo, aceite de té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de macadamia, aceite de germen de

10 trigo, aceite de almendra, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de girasol, aceite de cáñamo, aceite de bois, aceite de nuez de Kukui, aceite de aguacate, aceite de nuez, aceite de pescado, aceite de baya, aceite de pimienta de Jamaica, aceite de enebro, aceite de semilla, aceite de semilla de almendra, aceite de semilla de anís, aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez moscada, aceite de hoja de

15 albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela, aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón, aceite de hoja de melaleuca, aceite de oregano, aceite de hoja de pachuli, aceite de hoja de menta, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de menta verde, aceite de hoja del árbol de té, aceite de hoja de tomillo, aceite de hoja de té de Canadá, aceite de flor, aceite de camomila, aceite de salvia romana,

20 aceite de clavo, aceite de flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de flor de jazmín, aceite de flor de lavanda, aceite de flor de mauka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja, aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza de casia, aceite de corteza de canela, aceite de corteza de sasafrás, aceite de madera, aceite de madera de alcanfor, aceite de madera de cedro, aceite de palo de rosa, aceite de

25 sándalo, aceite de madera de jengibre, aceite de resina, aceite de recino, aceite de mirra, aceite de piel, aceite de piel de Bérnago, aceite de piel de pomelo, aceite de piel de limón, aceite de piel de lima, aceite de piel de naranja, aceite de piel de mandarina, aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido linoleico, oleil alcohol, alcohol de isostearilo, oleato de etilo, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Rylo®, Peceol® y Maisine®, derivados sintéticos o

30 semisintéticos de los mimos y combinaciones de los mismos. Preferentemente el aceite se selecciona de la lista que consiste en aceite de cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma,  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol® y Maisine® o mezclas de los mismos. De forma más preferida los aceites son Miglyol®, escualeno o  $\alpha$  tocoferol.

Tal como se ha definido anteriormente, las nanocápsulas de la invención también comprenden de manera opcional al menos un principio activo. El término “principio activo” se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que se utiliza para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales. El principio activo podrá ser por ejemplo un fármaco, un antígeno, una vitamina, etc. Los sistemas de nanocápsulas objeto de la presente invención son adecuados para incorporar principios activos de naturaleza lipófila o hidrófila. En una realización preferida, los ingredientes activos son antígenos de superficie recombinante de hepatitis B, antígeno de la influenza (H1N1) y docetaxel.

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

Por otro lado, los procedimientos de obtención de los sistemas de nanocápsulas de la invención son métodos sencillos que evitan condiciones drásticas como altas temperaturas. Además, tampoco es necesario llevar a cabo ningún tipo de reacción química para la obtención de los mismos, ya que según se ha indicado anteriormente la obtención del sistema implica interacciones no covalentes. Por tanto, se preserva así la integridad de las moléculas incorporadas al sistema, susceptibles de ser degradadas. Para lograr la formación de nanocápsulas en un rango de tamaños deseado, se procede a la formación de los núcleos oleosos que comprenden un aceite y uno o más tensoactivos, en cuya superficie se une el polímero de recubrimiento a través de diferentes tipos de interacción. Se trata, por tanto, de un proceso de difusión de solventes, que ocurre de manera controlada y proporciona estabilidad al sistema, sin que exista la necesidad de crear enlaces covalentes entre los componentes.

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

- a) preparar una disolución acuosa que comprende protamina, y opcionalmente un tensoactivo soluble en agua;
- b) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite y uno o más tensoactivos, caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido;

- c) mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas; y
- d) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

5

Los sistemas de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento alternativo (denominado en los ejemplos procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas) que comprende recubrir una nanoemulsión con protamina mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa del polímero. Asimismo, la formación de la nanoemulsión puede favorecerse mediante ultrasonidos (denominado en los ejemplos procedimiento de sonicación) u homogeneización (denominado en los ejemplos procedimiento de homogeneización).

En una realización particular, el proceso de incubación comprende mezclar la nanoemulsión con una disolución acuosa del polímero de recubrimiento. Dicha nanoemulsión está constituida al menos por un aceite, uno o más tensoactivos, caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8 y una fase acuosa. La fase acuosa puede contener otros agentes tensoactivos, sales, y otros agentes auxiliares.

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

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

- i) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite, uno o más tensoactivos, caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido;



- ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa que opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y que está bajo agitación para formar una nanoemulsión;
- iii) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta

5

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

- i) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite, uno o más
- tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a
- 8, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido;
- ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa que
- opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y sonicar;
- iii) diluir con agua la emulsión obtenida en la fase ii);
- iv) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta
- volumen constante.

10

15

Aún otro procedimiento particular para la obtención de la nanoemulsión (denominado en los ejemplos procedimiento de homogeneización) comprende:

- i) preparar una disolución orgánica que comprende un aceite, uno o más
- tensoactivos, caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior
- a 8, con la condición de que el tensoactivo no es un fosfolípido;
- ii) añadir la disolución obtenida en la etapa i) sobre una fase acuosa que
- opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y homogeneizar;
- iii) diluir con agua la emulsión obtenida en la fase ii) y homogeneizar;
- iv) opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta
- volumen constante.

20

25

Según realizaciones particulares de los procedimientos anteriores, si el principio activo es lipofílico o anfifílico, dicho ingrediente activo se añade a la disolución orgánica de la etapa b)

30

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

En el contexto de la presente invención se entiende por lipofílico a las moléculas, sustancias, principios activos, estructuras o parte de ellas que no son capaces de interaccionar por si sola  
10 con moléculas de agua y son principalmente disueltas en solventes apolares.

En el contexto de la presente invención se entiende por anfílico a las moléculas, sustancias, principios activos, estructuras o parte de ellas que poseen tanto propiedades hidrofóbicas como hidrofílicas.

En el contexto de la presente invención se entiende por hidrofílico a las moléculas, sustancias, principios activos, estructuras o parte de ellas que son atraídas por el agua y son capaces de  
15 disolverse en ella o en solventes polares

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

El disolvente de la disolución orgánica es preferentemente una mezcla de disolventes polares  
25 tales como etanol, isopropanol y acetona pudiendo incluir además disolventes no polares como por ejemplo el diclorometano. En esta fase orgánica se incorpora el aceite y el o los tensoactivos, caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8. En una composición particular se incorpora igualmente el ingrediente activo.

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

- a) preparar una disolución acuosa de 20 ml al 0,05 % p/v de Protamina;
- b) preparar una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona un o ambos tensoactivos (Colato de Sodio y/o PEG estearato), a la que se le adiciona Miglyol® 812.
- 5 c) mezclar bajo agitación las disoluciones resultantes de las etapas a) y b), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas;
- d) opcionalmente, evaporar los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

10 El procedimiento de elaboración de los sistemas de nanocápsulas puede incluir una etapa adicional de liofilización, con el fin de preservarlos durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales. Debido a la naturaleza de la cubierta de las nanocápsulas de la presente invención, así como de las características de las mismas, no es necesario emplear crioprotectores durante la liofilización. Otra ventaja adicional, es que no es necesario diluir el sistema coloidal antes de la liofilización, ya que los sistemas nanocapsulares de la invención no forman agregados durante la reconstitución del liofilizado.

15 Alternativamente, es posible añadir uno o mas azúcares que ejerzan efecto crioprotector como por ejemplo trehalosa, glucosa, sucrosa, manitol, maltosa, polivinil pirrolidona (PVP). En forma liofilizada, las nanocápsulas pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo, y ser fácilmente regeneradas, en caso necesario, simplemente añadiendo un volumen de agua óptimo.

De acuerdo con esta etapa adicional, la presente invención se refiere también a los sistemas de nanocápsulas que comprenden una cubierta de protamina bajo forma de liofilizado.

25 Adicionalmente, la invención en una realización particular se refiere al sistema nanocápsular de la invención para su uso en terapia. Más concretamente, a una composición farmacéutica, que comprende los sistemas de nanocápsulas de la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En particular, la incorporación de principios activos en las nanocápsulas de la invención origina sistemas, cuyas características en cuanto a su composición, propiedades y morfología, les convierte en excelentes candidatos para el área de la terapéutica. El principio activo a incorporar en los sistemas de la invención será aquél con propiedades farmacoterapéuticas adecuadas de acuerdo con la aplicación terapéutica a la

cual sea destinada la formulación. En una realización particular, el principio activo se selecciona entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos como oligonucleótidos, polinucleótidos o bien combinaciones de las moléculas citadas.

5

En una realización preferida, el principio activo lipofílico es docetaxel.

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

En una realización preferida, los principios activos hidrofílicos son el antígeno de superficie  
20 recombinante de hepatitis B y el antígeno de la influenza (H1N1).

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

25 La proporción de principio activo incorporado en los sistemas puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 50% en peso con respecto al peso total, base seca, de los componentes del sistema de nanocápsulas. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso del ingrediente activo que va a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración. En una realización particular, la proporción de principio activo lipofílico  
30 puede llegar a ser de hasta aproximadamente el 10% en peso, preferentemente hasta aproximadamente el 5%.

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

Tal como se ha definido anteriormente, la invención se refiere al uso de dicho sistema en la preparación de un medicamento. En una realización particular, dicho uso está relacionado con el uso de vacunas o el tratamiento del cáncer. En este sentido, en una realización preferida de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende como principio activo docetaxel y se usa para el tratamiento del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón o páncreas. Alternativamente, la presente invención también se refiere al uso del sistema nanocapsular de la invención comprendiendo como principio activo docetaxel para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón o páncreas.

En otra realización preferida de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende como principio activo el antígeno recombinante de la hepatitis B (rHBsAg) y se usa para el tratamiento o prevención de la hepatitis B. Alternativamente, la presente invención también se refiere al uso del sistema nanocapsular de la invención comprendiendo como principio activo el antígeno recombinante de la hepatitis B (rHBsAg) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la hepatitis B.

En aún otra realización preferida de la invención, el sistema nanocapsular de la invención comprende como principio activo el antígeno recombinante de la influenza H1N1 (HI) y se usa para el tratamiento o prevención de la influenza del tipo H1N1. Alternativamente, la presente invención también se refiere al uso del sistema nanocapsular de la invención comprendiendo como principio activo el antígeno recombinante de la influenza H1N1 (HI) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la la influenza H1N1.

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

## 5 Ejemplos

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

1. **Pr**: Protamina; la sal utilizada en los siguientes ejemplos fue sulfato de protamina (Yuki Gosei Kogyo Co, Ltd.). Se utilizó otra sal de protamina (SIGMA) sin encontrarse diferencias significativas para ninguno de los ejemplos.
2. **PEG**: estearato de polietilenglicol. Simulsol® M52 PEG-2000 (Seppic).
3. **Nanoemulsión (NE)**: Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos para referirse a los nanosistemas comprendidos por un aceite y uno o más tensoactivos que posean un HLB superior a 8; de forma preferida el o los tensoactivos utilizados fueron: Colato de Sodio, PEG estearato, Solutol HS15®, TPGS, Tween 20® y Tween 80® o combinación de los mismos. La única diferencia con las nanocápsulas es la ausencia de protamina en el recubrimiento de la superficie de los sistemas.
4. **Nanocápsulas (NCs)** de Pr = Este término se utiliza por simplicidad en los ejemplos y las figuras para referirse a los nanosistemas cuyas nanocápsulas comprenden un aceite, uno o más tensoactivos que posean un HLB superior a 8; de forma preferida el o los tensoactivos utilizados fueron: Colato de Sodio, PEG estearato, Solutol HS15®, TPGS, Tween 20, Tween 80 o combinación de los mismos. Por último el recubrimiento de Pr.
5. **DCX**: Docetaxel.
6. **rHBsAg**: Antígeno recombinante de la hepatitis B.
7. **HI**: Antígeno de la influenza H1N1

### Ejemplo 1:

Ejemplo 1.1. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- i) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- ii) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® y 15 mg de fosfolípidos (lecitina,

lisofosfatidilcolina, lecitina hidroxilada Yelkin®, lecitina libre de aceites Ultralec®).

- iii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 1 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados:

**Tabla 1**

| Formulación | Fosfolípido               | Tamaño (nm) | PI | Potencial z (nm) |
|-------------|---------------------------|-------------|----|------------------|
| NC Pr       | Lecitina                  | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | Lisofosfatidilcolina      | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | Lecitina hidroxilada      | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | Lecitina libre de aceites | Agregados   |    |                  |

Ejemplo 1.2. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- i) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® y diferentes cantidades de fosfolípidos (lecitina o lisofosfatidilcolina).
- ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de una solución acuosa bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión.
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.
- iv) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml, en una proporción 1:1 y 1:2 (ml nanoemulsión:mg de Pr), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 2 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de fosfolípidos y distintas relaciones de protamina en la etapa iv).

**Tabla 2**

| Formulación | Fosfolípido          | Cantidad de fosfolípido (mg) | Pr etapa iv (mg) | Tamaño (nm) | PI | Potencial z (nm) |
|-------------|----------------------|------------------------------|------------------|-------------|----|------------------|
| NC Pr       | lecitina             | 15                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                      |                              | 2                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                      | 30                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                      |                              | 2                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | lisofosfatidilcolina | 15                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                      |                              | 2                | Agregados   |    |                  |

Ejemplo 1.3. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- v) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- vi) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución diclorometano/acetona (en relaciones del 0,1:4,5 ml al 0,25:4,5ml), 62,5 µl de Miglyol® y una cantidad de lecitina hidroxilada (Yelkin®) o libre de aceite (Ultralec®).
- vii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- viii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 1 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados:



**Tabla 1**

| Formulación | Fosfolípido              | Mg de lecitina | Tamaño (nm) | PI | Potencial z (nm) |
|-------------|--------------------------|----------------|-------------|----|------------------|
| NC Pr       | Lecitina                 | 15             | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | Hidroxilada              | 30             | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | Lecitina libre de aceite | 15             | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          | 30             | Agregados   |    |                  |

Ejemplo 1.4. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

v) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución diclorometano/acetona (en relaciones del 0,1:4,5 ml al 0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® y diferentes cantidades de fosfolípidos (lecitina hidroxilada o lecitina libre de aceites).

vi) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de una solución acuosa bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión.

vii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

viii) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml, en una proporción 1:1 y 1:2 (ml nanoemulsión:mg de Pr), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 2 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de fosfolípidos y distintas relaciones de protamina en la etapa iv).

**Tabla 2**

| Formulación | Fosfolípido              | Cantidad de fosfolípido (mg) | Pr etapa iv (mg) | Tamaño (nm) | PI | Potencial z (nm) |
|-------------|--------------------------|------------------------------|------------------|-------------|----|------------------|
| NC Pr       | Lecitina Hidroxilada     | 15                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          |                              | 2                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          | 30                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          |                              | 2                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       | Lecitina libre de aceite | 15                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          |                              | 2                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          | 30                           | 1                | Agregados   |    |                  |
| NC Pr       |                          |                              | 2                | Agregados   |    |                  |

## 5 **Ejemplo 2:**

Ejemplo 2.1. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- i) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve Pr a una concentración de 0,05 p/v. Adicionalmente esta disolución puede estar al 0,25 % p/v de poloxámero 188.
- ii) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® 40 mg de colato de sodio y 48 mg de PEG estearato.
- iii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 3 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados:

**Tabla 3**

| Formulación | Poloxamer 188 | Tamaño (nm) | PI    | Potencial z (mv) |
|-------------|---------------|-------------|-------|------------------|
| NC Pr       | NO            | 227 ± 6     | 0,139 | +20 ± 2          |
| NC Pr       | Si            | 229 ± 20    | 0,153 | +16 ± 2          |

Ejemplo 2.2 Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® 40 mg de colato de sodio y 48 mg de PEG estearato.
- ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de una solución acuosa bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión:
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.
- iv) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml de, en una proporción 1:1 y 1:2 (mL nanoemulsión:mg de protamina), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 4 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de Pr en la etapa iv).

**Tabla 4**

| Formulación                      | Tamaño (nm) | PI    | Potencial z (mv) |
|----------------------------------|-------------|-------|------------------|
| NC Pr (1 mL NE por 1 mg péptido) | 206 ± 2     | 0,095 | +22 ± 2          |
| NC Pr (1 mL NE por 2 mg péptido) | 210 ± 3     | 0,074 | +25 ± 6          |

Ejemplo 2.3. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol y diferentes cantidades de PEG-estearato según el procedimiento de  
 5 difusión de disolvente en una etapa:

- i) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 mg/ml.
- ii) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 60 mg de  $\alpha$  tocoferol y diferentes cantidades de PEG-estearato.
- 10 iii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

15 Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 5 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PEG- estearato.

**Tabla 5**

| Formulación | PEG etapa ii<br>(mg) | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(mV) |
|-------------|----------------------|----------------|-----|---------------------|
| NC Pr       | 48                   | 214 $\pm$ 15   | 0,2 | +1 $\pm$ 2          |
| NC Pr       | 24                   | 214 $\pm$ 31   | 0,2 | +9 $\pm$ 5          |
| NC Pr       | 12                   | 234 $\pm$ 5    | 0,2 | +17 $\pm$ 4         |

Ejemplo 2.4. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 60 mg de  $\alpha$  tocoferol y diferentes cantidades de PEG-estearato.
- ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de una solución acuosa bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión:
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.
- iv) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml, en una proporción 1:1 y 1:2 (ml nanoemulsión:mg de protamina), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 6 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PEG- estearato y distintas relaciones de protamina en la etapa iv).

**Tabla 6**

| Formulación | PEG etapa i<br>(mg) | Pr etapa iv<br>(mg) | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(nm) |
|-------------|---------------------|---------------------|----------------|-----|---------------------|
| NC Pr       | 48                  | 1                   | 205 $\pm$ 10   | 0,1 | +4 $\pm$ 3          |
| NC Pr       |                     | 2                   | 210 $\pm$ 15   | 0,2 | +6 $\pm$ 9          |
| NC Pr       | 24                  | 1                   | 205 $\pm$ 9    | 0,1 | +17 $\pm$ 5         |
| NC Pr       |                     | 2                   | 216 $\pm$ 17   | 0,2 | +4 $\pm$ 2          |
| NC Pr       | 12                  | 1                   | 226 $\pm$ 7    | 0,2 | +16 $\pm$ 9         |
| NC Pr       |                     | 2                   | 238 $\pm$ 18   | 0,2 | +9 $\pm$ 6          |

Ejemplo 2.5. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de escualeno y diferentes cantidades de tensoactivos según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- 5            i)        se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- ii)        se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución de acetona (4,75 ml), 62,5  $\mu$ l de escualeno y diferentes cantidades de PEG-estearato.
- 10           iii)        se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- iv)        se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así  
15 como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 7 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PEG- estearato:

**Tabla 7**

| Formulación | PEG etapa ii<br>(mg) | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(mV) |
|-------------|----------------------|----------------|-----|---------------------|
| NC Pr       | 48                   | 235 $\pm$ 4    | 0,2 | -3 $\pm$ 3          |
| NC Pr       | 12                   | 250 $\pm$ 6    | 0,2 | +11 $\pm$ 5         |

Ejemplo 2.6. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de escualeno según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución acetona (4,5 ml), 62,5  $\mu$ l de escualeno y diferentes cantidades de PEG-estearato.
- ii) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de una solución acuosa bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión:
- iii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.
- iv) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml, en una proporción 1:1 y 1:2 (ml nanoemulsión:mg de protamina), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 8 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de PEG- estearato y distintas relaciones de protamina en la etapa iv).

**Tabla 8**

| Formulación | PEG etapa i<br>(mg) | Pr etapa iv<br>(mg) | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(nm) |
|-------------|---------------------|---------------------|----------------|-----|---------------------|
| NC Pr       | 96                  | 1                   | 227 $\pm$ 2    | 0,2 | +26 $\pm$ 1         |
| NC Pr       |                     | 2                   | 228 $\pm$ 2    | 0,2 | +10 $\pm$ 1         |
| NC Pr       | 48                  | 1                   | 238 $\pm$ 5    | 0,2 | +19 $\pm$ 2         |
| NC Pr       |                     | 2                   | 232 $\pm$ 6    | 0,2 | +0,6 $\pm$ 3        |

Ejemplo 2.7. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol y diferentes tensoactivos según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- 5            i)        se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- ii)        se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), y 3 relaciones diferentes de  $\alpha$  tocoferol y como tensoactivo se empleó PEG-estearato (PEG-st) o Solutol HS15. Las relaciones en masa fueron
- 10           iii)        se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- iv)        se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

15

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 9 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados.

20

**Tabla 9**

| Surfactante                          | PEG-St       |     |                  | Solutol HS15 |      |                  |
|--------------------------------------|--------------|-----|------------------|--------------|------|------------------|
| Relación (núcleo oleoso:surfactante) | Tamaño (nm)  | PI  | Potencial z (mV) | Tamaño (nm)  | PI   | Potencial z (mV) |
| 12:12                                | 218 $\pm$ 11 | 0,1 | +6 $\pm$ 1       | 146 $\pm$ 1  | 0,01 | -1 $\pm$ 0.4     |
| 60:12                                | 234 $\pm$ 5  | 0,2 | +17 $\pm$ 4      | 250 $\pm$ 39 | 0,3  | 23 $\pm$ 5       |
| 60:60                                | 203 $\pm$ 3  | 0,1 | -4 $\pm$ 0,5     | 176 $\pm$ 23 | 0,2  | -2 $\pm$ 0,5     |



Ejemplo 2.8. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol y diferentes tensoactivos según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- i) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- ii) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), y 3 relaciones diferentes de  $\alpha$  tocoferol y como tensoactivo se empleó Tween 20 o Tween 80. Las relaciones en masa fueron de 12:12, y 60:12 de  $\alpha$  tocoferol:tensoactivo, respectivamente
- iii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 10 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados:

**Tabla 10**

| Surfactante                          | Tween 20      |       |                  | Tween 80     |     |                  |
|--------------------------------------|---------------|-------|------------------|--------------|-----|------------------|
| Relación (núcleo oleoso:surfactante) | Tamaño (nm)   | PdI   | Potencial z (mV) | Tamaño (nm)  | PdI | Potencial z (mV) |
| 12:12                                | 143 $\pm$ 15  | 0,4   | +18 $\pm$ 3      | 105 $\pm$ 25 | 0,2 | +19 $\pm$ 2      |
| 60:12                                | 232 $\pm$ 148 | 0,314 | +11 $\pm$ 1      | 221 $\pm$ 26 | 0,2 | +13 $\pm$ 4      |

Ejemplo 2.9. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol y TPGS según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- i) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 mg/ml.
- 5 ii) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 60 mg de  $\alpha$  tocoferol y 24 mg de TPGS.
- iii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- 10 iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 11 muestra los valores obtenidos.

15 **Tabla 11**

| Formulación | Tamaño (nm) | PI  | Potencial z (mV) |
|-------------|-------------|-----|------------------|
| NC Pr       | 189 $\pm$ 5 | 0,2 | +21 $\pm$ 6      |

Ejemplo 2.10. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- v) se preparó una disolución acuosa (10 ml) en la que se disuelve Pr a una concentración de 0,05 p/v.
- vi) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® y 40 mg de colato de sodio.
- vii) se mezclaron bajo agitación magnética durante 10 minutos las disoluciones resultantes de las etapas i) y ii), obteniéndose espontáneamente las nanocápsulas.
- viii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 12 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados.

**Tabla 12**

| Formulación | Tamaño (nm) | PI  | Potencial z (mv) |
|-------------|-------------|-----|------------------|
| NC Pr       | 551 ± 50    | 0.6 | +47 ± 1          |

Ejemplo 2.11 Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de Miglyol® según el procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas:

v) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 62,5 µl de Miglyol® y 40 mg de colato de sodio.

vi) se añade la disolución obtenida en la etapa i) sobre 10 ml de una solución acuosa bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente la nanoemulsión:

vii) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

viii) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iii) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml de, en una proporción 1:1 y 1:2 (mL nanoemulsión:mg de protamina), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 13 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de Pr en la etapa iv).

**Tabla 13**

| Formulación                      | Tamaño (nm) | PI    | Potencial z (mv) |
|----------------------------------|-------------|-------|------------------|
| NC Pr (1 mL NE por 1 mg péptido) | 590 ± 7     | 0,270 | +43 ± 1          |

Ejemplo 2.12. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol según el procedimiento de sonicación, en una etapa:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución 24 mg de PEG-estearato, 120 mg de  $\alpha$  tocoferol en diclorometano (1 ml).
- 5 ii) se preparó una disolución acuosa en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- iii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua y se sonicó durante 30 segundos.
- iv) se diluyó la emulsión obtenida con la disolución obtenida en ii (dilución 1:10);  
10 para formar las NC.
- v) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 14 se muestran los valores obtenidos.

15

**Tabla 14**

| Formulación  | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial Z<br>(mv) |
|--------------|----------------|-----|---------------------|
| NC Protamina | 340 $\pm$ 131  | 0,4 | -5 $\pm$ 1          |

Ejemplo 2.13. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol según el procedimiento de homogeneización, en una etapa:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución 24 mg de PEG-estearato, 120 mg de  $\alpha$  tocoferol en diclorometano (1 ml).
- ii) se preparó una disolución acuosa en la que se disuelve protamina a una concentración de 0,05 p/v.
- iii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua y se homogeneizó a 16.000 rpm durante 5 minutos y posteriormente a 19.000 rpm durante otros 5 minutos.
- iv) se diluyó la emulsión obtenida con la disolución preparada en ii (dilución 1:10) y se homogeneizó durante 3 minutos a 22.000 rpm; para formar las NC.
- v) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 15 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados.

**Tabla 15:**

| Formulación | Tamaño (nm)   | PI  | Potencial z (mv) |
|-------------|---------------|-----|------------------|
| NC Pr       | 289 $\pm$ 190 | 0,3 | +1 $\pm$ 2       |

Ejemplo 2.14 Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol según el procedimiento de sonicación, en dos etapas:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución 24 mg de PEG-estearato, 120 mg de  $\alpha$  tocoferol en diclorometano (1 ml).
- ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua y se sonicó durante 30 segundos.
- iii) se diluyó la emulsión obtenida con agua (dilución 1:10).
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante para formar una nanoemulsión catiónica.
- v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por Pr a una concentración de 1 o 2 mg/ml, en una proporción 1:1 y 1:2 (mL nanoemulsión:mg de protamina), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 16 se muestran los valores obtenidos.

**Tabla 16**

| Formulación                        | Tamaño (nm)  | PI  | Potencial z (mv) |
|------------------------------------|--------------|-----|------------------|
| Nanoemulsión                       | 201 $\pm$ 70 | 0.3 | -16 $\pm$ 5      |
| NC Pr Incubación (1ml NE/mg Pr)    | 160 $\pm$ 15 | 0,2 | -4 $\pm$ 1       |
| NC Pr Incubación (0,5 ml NE/mg Pr) | 151 $\pm$ 13 | 0,1 | -4 $\pm$ 1       |

Ejemplo 2.15. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol según el procedimiento de homogeneización, en dos etapas:

- i) Se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución 24 mg de PEG-estearato, 120 mg de  $\alpha$  tocoferol en diclorometano (1 ml).
- ii) se añadió la disolución obtenida en la etapa i) sobre 2 ml de agua y se homogeneizó a 16.000 rpm durante 5 minutos y posteriormente a 19.000 rpm durante otros 5 minutos.
- iii) se diluyó la emulsión obtenida con agua (dilución 1:10) y se homogeneizó durante 3 minutos a 22.000 rpm.
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante para formar una nanoemulsión.
- v) se recubrió la nanoemulsión obtenida en la etapa iv) mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa (1 ml) compuesta por protamina a una concentración de 1 o 2 mg/ml, en una proporción 1:1 y 1:2 (mL nanoemulsión:mg de protamina), produciéndose de forma inmediata el recubrimiento, independientemente de la temperatura.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). En la tabla 17 se muestran los valores obtenidos de los parámetros citados.

**Tabla 17**

| Formulación                        | Tamaño (nm)  | PI  | Potencial z (mv) |
|------------------------------------|--------------|-----|------------------|
| Nanoemulsión                       | 187 $\pm$ 36 | 0,3 | -11 $\pm$ 4      |
| NC Pr Incubación (1ml NE/mg Pr)    | 165 $\pm$ 43 | 0,1 | -1 $\pm$ 1       |
| NC Pr Incubación (0,5 ml NE/mg Pr) | 170 $\pm$ 37 | 0,2 | -4 $\pm$ 7       |



**Ejemplo 3. Evaluación de las características físico-químicas de las nanocápsulas de Protamina con núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol en función de la cantidad de Protamina.**

Ejemplo 3.1. Se prepararon nanocápsulas de protamina constituidas por un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol según el procedimiento de difusión de disolvente en una etapa:

- i) Se preparó una disolución acuosa de protamina (10ml) en la que se disuelven de 100 a 1 mg de protamina.
- ii) se preparó una fase oleosa compuesta por una disolución etanol/acetona (0,25:4,5 ml), 60 mg de  $\alpha$  tocoferol, 5 mg de colato de sodio y 12 mg de PEG-estearato.
- iii) se añade la disolución obtenida en la etapa ii) sobre los 10 ml de la solución acuosa de protamina preparada en i) bajo agitación magnética manteniéndose durante 10 minutos, de este modo se obtiene espontáneamente las nanocápsulas.
- iv) se evaporaron los disolventes orgánicos hasta volumen constante.

Una vez preparadas, se midió su diámetro medio, índice de polidispersión (PI) así como su carga eléctrica superficial (potencial zeta). La tabla 18 muestra los valores obtenidos de los parámetros citados en función de la cantidad de de protamina en la disolución acuosa de la etapa i). Se puede observar la posibilidad de obtención del sistema a pesar de la variación de Pr.

**Tabla 18**

| Formulación | Protamina etapa i<br>(mg) | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(mv) |
|-------------|---------------------------|----------------|-----|---------------------|
| NC Pr       | 100                       | 196 $\pm$ 10   | 0,2 | +7 $\pm$ 6          |
| NC Pr       | 50                        | 228 $\pm$ 28   | 0,2 | +4 $\pm$ 6          |
| NC Pr       | 25                        | 203 $\pm$ 10   | 0,2 | +10 $\pm$ 2         |
| NC Pr       | 10                        | 207 $\pm$ 9    | 0,2 | +15 $\pm$ 8         |
| NC Pr       | 5                         | 214 $\pm$ 10   | 0,2 | +18 $\pm$ 4         |
| NC Pr       | 1                         | 213 $\pm$ 23   | 0,2 | +7 $\pm$ 22         |

#### **Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad de encapsulación del fármaco lipofílico docetaxel en nanocápsulas de protamina**

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por PEG estearato y  $\alpha$  tocoferol o Miglyol®. Se procedió a la incorporación de un fármaco lipofílico, tomando para ello el docetaxel, un agente antitumoral prácticamente insoluble en agua. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 2.1, con una modificación, ya que una pequeña alícuota de una solución stock del ingrediente activo en etanol (1-100 mg/ml) es incorporada a la fase oleosa. Posteriormente se eliminaron los solventes orgánicos por medio del rotavapor hasta obtener un volumen constante formándose las nanocápsulas de protamina encapsulando docetaxel.

Una vez preparadas las nanocápsulas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando el fármaco libre mediante cromatografía líquida de alta resolución, con  $\lambda=227\text{nm}$ ), obteniéndose una eficacia de encapsulación de 35 %. También se midieron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 19 ). Se puede apreciar la posibilidad de incorporar principios activos de naturaleza hidrofóbica de manera eficaz, sin haber diferencias significativas en la inclusión de Pr en la NE.

**Tabla 19**

| Formulación                                         | Size (nm)    | PI  | Potencial z (mV) | Encapsulación (%) |
|-----------------------------------------------------|--------------|-----|------------------|-------------------|
| NE $\alpha$ tocoferol                               | 214 $\pm$ 10 | 0,1 | -24 $\pm$ 4      |                   |
| NE $\alpha$ tocoferol (10 $\mu\text{g/ml}$ DCX)     | 227 $\pm$ 11 | 0,2 | -12 $\pm$ 3      | 32 $\pm$ 10       |
| NC Pr/ $\alpha$ tocoferol                           | 234 $\pm$ 5  | 0,2 | +17 $\pm$ 4      |                   |
| NC Pr/ $\alpha$ tocoferol (10 $\mu\text{g/ml}$ DCX) | 226 $\pm$ 9  | 0,2 | -2 $\pm$ 1       | 38 $\pm$ 4        |
| NC Pr/ $\alpha$ tocoferol (20 $\mu\text{g/ml}$ DCX) | 223 $\pm$ 6  | 0,2 | +4 $\pm$ 7       | 37 $\pm$ 6        |
| NE Miglyol®                                         | 209 $\pm$ 4  | 0,1 | -27 $\pm$ 1      |                   |
| NE Miglyol® (10 $\mu\text{g/ml}$ DCX)               | 242 $\pm$ 17 | 0,2 | -13 $\pm$ 1      | 35 $\pm$ 17       |
| NC Pr Miglyol®                                      | 227 $\pm$ 6  | 0,1 | +20 $\pm$ 2      |                   |
| NC Pr Miglyol® (10 $\mu\text{g/ml}$ DCX)            | 236 $\pm$ 12 | 0,2 | -1 $\pm$ 2       | 30 $\pm$ 12       |
| NC Pr Miglyol® (20 $\mu\text{g/ml}$ DCX)            | 233 $\pm$ 6  | 0,2 | 4 $\pm$ 7        | 30 $\pm$ 10       |

**Ejemplo 5. Estudio de la capacidad de inhibición de la proliferación celular de las nanocápsulas de protamina**

Con el fin de evaluar el potencial de las nanocápsulas de protamina que encapsulan docetaxel para inhibir la proliferación celular de las líneas celular de cáncer de pulmón NCI-  
5 H460 y A549 y en línea celular de cáncer de páncreas MiaPaCa2 y BxPC3, se prepararon las nanocápsulas de protamina según el procedimiento descrito en el ejemplo 4. Para este estudio se analizan cuatro tratamientos; (i) etanol (ii) disolución de DCX en etanol, (iii) nanocápsulas blancas como controles y (iv) nanocápsulas cargadas con DCX, diluidas en medio de cultivo (DMEM). Transcurrido el tiempo de incubación (24 y 48h), se trataron las muestras con  
10 Cristal violeta y las células solubilizadas se cuantificaron por determinación espectrofotométrica ( $\lambda = 590$  nm). Las siguientes figuras (1-4) muestran los resultados de este estudio:

Como se puede observar en los diferentes gráficos, la actividad del docetaxel en etanol es  
15 comparable con la del mismo fármaco encapsulado en las Ncs de Pr, para los diferentes tiempos y para las diferentes líneas celulares. Esto permitiría concluir la posibilidad de administración de estos sistemas *in vivo* sin la necesidad de otros excipientes, como el cremophor o altas concentraciones de tween 80, causante de la biodistribución irracional de estos sistemas y de las principales reacciones adversas que presentan.

20

25

### **Ejemplo 6. Evaluación de la capacidad de encapsulación de otras moléculas lipofílicas en las nanocápsulas de protamina**

#### **5 Ejemplo 6.1. Encapsulación de rodamina 6G en las nanocápsulas de protamina**

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por  $\alpha$  tocoferol. Se procedió a la incorporación de una molécula lipofílica, tomando para ello rodamina 6G, un compuesto orgánico heterocíclico, además de ser un medio de contraste fluorescente y perteneciente a la familia de las rodaminas. El procedimiento de elaboración  
 10 corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 2.1, con una modificación, ya que una pequeña alícuota de una solución stock del ingrediente activo en etanol (1 mg/ml) es incorporada a la fase oleosa. Posteriormente se eliminan los solventes orgánicos del sistema hasta obtener un volumen constante formándose las nanocápsulas de protamina encapsulando rodamina 6G.

15 Una vez preparadas las nanocápsulas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando la cantidad de rodamina libre mediante espectroscopia visible,  $\lambda=530$  nm.). Los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta se presentan en la tabla 20. Como se puede concluir, es posible incluir  
 20 diferentes moléculas de características hidrofóbicas al núcleo de las NC de Pr.

**Tabla 20**

| Formulación              | Tamaño (nm) | PI  | Potencial z (mv) | Encapsulación % |
|--------------------------|-------------|-----|------------------|-----------------|
| NC Protamina rodamina 1% | 230 $\pm$ 4 | 0.2 | +24 $\pm$ 2      | 58 $\pm$ 1      |

## Ejemplo 6.2. Encapsulación de curcumina en las nanocápsulas de protamina

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por  $\alpha$  tocoferol. Se procedió a la incorporación de una molécula lipofílica, tomando para ello curcumina, un fenol natural con cierta actividad antitumoral, analgésica y antimicrobiana, entre otras. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 2.8, utilizando tween 80 como surfactante, en una relación en masa 60:12  $\alpha$  tocoferol:tween 80; y con una modificación, ya que una pequeña alícuota de una solución stock del ingrediente activo en etanol (1 mg/ml) es incorporada a la fase oleosa. Posteriormente se eliminan los solventes orgánicos del sistema hasta obtener un volumen constante formándose las nanocápsulas de protamina encapsulando curcumina.

Una vez preparadas las nanocápsulas según el procedimiento de la invención se determinó la eficacia de encapsulación (evaluando la cantidad de curcumina libre mediante fluorescencia.) Los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta se presentan en la tabla 21. Como se puede concluir, es posible incluir diferentes moléculas de características hidrofóbicas al núcleo de las NC de Pr, sin importar el tensoactivo que se utilice.

**Tabla 21**

|              | Curcumina<br>teórica<br>(%) | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(mv) | Encapsulación<br>(%) |
|--------------|-----------------------------|----------------|-----|---------------------|----------------------|
| NC Protamina | 10                          | 198 $\pm$ 31   | 0,2 | +33 $\pm$ 15        | 73 $\pm$ 14          |
|              | 30                          | 188 $\pm$ 27   | 0,2 | +18 $\pm$ 9         | 65 $\pm$ 8           |

**Ejemplo 7****Evaluación de la capacidad de adsorción del antígeno recombinante de hepatitis B en nanocápsulas de protamina**

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por PEG estearato y como aceite  $\alpha$  tocoferol, escualeno o Miglyol® 812. Se procedió a la asociación de un antígeno hidrofílico, tomando para ello el antígeno recombinante de la hepatitis B (rHBsAg). El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 2.1, Posteriormente se incubó una alícuota del antígeno con las nanocápsulas de protamina ya formadas, teniendo para ello, diferentes relaciones de masa (protamina: antígeno).

Una vez preparadas las nanocápsulas con el antígeno adsorbido se determinó la eficacia de asociación de alguna de estas formulaciones a través de ELISA y se cuantificaron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 22). Como se puede observar en la tabla, las NC de Pr asocian eficazmente gran cantidad de rHBsAg a su superficie.

**Tabla 22**

| Formulación                          | Tamaño (nm)  | PI  | Potencial z (mV) | Asociación (%) |
|--------------------------------------|--------------|-----|------------------|----------------|
| NC Pr Miglyol® : rHbAg 6:1           | 218 $\pm$ 15 | 0,2 | +18 $\pm$ 3      |                |
| NC Pr Miglyol® : rHbAg 4:1           | 211 $\pm$ 18 | 0,2 | +17 $\pm$ 3      | 70 $\pm$ 1     |
| NC Pr Miglyol® : rHbAg 2:1           | 222 $\pm$ 27 | 0,2 | +5 $\pm$ 9       |                |
| NC Pr Miglyol® : rHbAg 1:1           | 263 $\pm$ 76 | 0,3 | -1 $\pm$ 1       |                |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : rHbAg 6:1 | 221 $\pm$ 19 | 0,1 | +17 $\pm$ 7      | 82 $\pm$ 4     |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : rHbAg 4:1 | 226 $\pm$ 11 | 0,1 | +23 $\pm$ 1      | 72 $\pm$ 5     |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : rHbAg 2:1 | 206 $\pm$ 19 | 0,2 | +6 $\pm$ 10      |                |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : rHbAg 1:1 | 209 $\pm$ 10 | 0,2 | +12 $\pm$ 9      |                |
| NC Pr $\alpha$ escualeno:rHbAg 4:1   | 226 $\pm$ 19 | 0,2 | +8 $\pm$ 3       | 82 $\pm$ 1     |

**Ejemplo 8**Estudio de inmunización con las nanocápsulas de protamina cargadas con el antígeno recombinante de hepatitis B

- 5           Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol (TCPH) y escualeno (SQL). Se procedió a la asociación antígeno recombinante de la hepatitis B (rHBsAg) en una relación 4:1 NC:HBsAg. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 7.
- 10       La habilidad de las NC para inducir respuesta inmune fue medida en ratones hembras BALB/c, la respuesta fue cuantificada a través de ELISA los días 42, 126 y 183. Los animales tuvieron ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con temperatura constante a 22°C, con agua y alimentos ad libitum. Los animales estuvieron consientes durante la inmunización y la toma de muestras. Los ratones fueron utilizados de acuerdo a las directrices de la
- 15       normativa española (decreto real 1201/2005). Grupos de 7 ratones fueron elegidos al azar y fueron inmunizados con una dosis de 10  $\mu$ g de antígeno adsorbido en las NC Pr los días 0 y 28 para administración intramuscular (im) y días 0,28 y 112 por vía intranasal (in). Para NC Pr-TOCOPH se probó una administración combinada, siendo el día 0 intramuscular y el día 28 y 112 intranasal (im, in). El siguiente gráfico, señala los resultados obtenidos para el
- 20       estudio realizado.

Teniendo en cuenta de que el valor de 100 (mUI/ml) IgG, se considera valores protectores, se puede apreciar en la figura 5, que las NC Pr alcanzan dicha protección por vía intramuscular y el tratamiento combinado (im, in) sin importar el aceite utilizado. Por vía nasal, aunque no se

25       logra este nivel, se conoce que una administración transmucosa como esta de preferencia estimula una respuesta inmune de tipo celular; por lo que no se descarta la protección de esta enfermedad.

**Ejemplo 9**Evaluación de la capacidad de adsorción del antígeno de influenza a las nanocápsulas de protamina con núcleo de  $\alpha$  tocoferol

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por PEG  
 5 estearato y como aceite  $\alpha$  tocoferol. Se procedió a la asociación de un antígeno de naturaleza  
 proteica e hidrofílico, tomando para ello el antígeno de la influenza H1N1 (HI). El  
 procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el  
 ejemplo 2.1, Posteriormente se incubó una alícuota del antígeno con las nanocápsulas de  
 protamina ya formadas, teniendo para ello, diferentes relaciones de masa (protamina:  
 10 antígeno).

Una vez preparadas las nanocápsulas con el antígeno adsorbido se determinó la eficacia de  
 asociación de la formulación 4:1 NC: antígeno a través de western blot y se evaluaron los  
 parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 20).

15 Como se puede apreciar en la tabla 23, las características fisicoquímicas del sistema no se ven  
 afectadas tras la adsorción del HI. Las NC Pr asocian eficientemente el antígeno de naturaleza  
 proteica.

**Tabla 23**

| Formulación                       | Tamaño<br>(nm) | PI  | Potencial z<br>(mV) | %<br>Asociación |
|-----------------------------------|----------------|-----|---------------------|-----------------|
| NC Pr $\alpha$ tocoferol          | 211 $\pm$ 9    | 0.2 | +17.42 $\pm$ 4      |                 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : HI 6:1 | 207 $\pm$ 10   | 0.1 | +20 $\pm$ 7         |                 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : HI 4:1 | 205 $\pm$ 10   | 0.1 | + 13 $\pm$ 3        | 71 $\pm$ 10     |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol : HI 2:1 | 321 $\pm$ 184  | 0.1 | +12 $\pm$ 3         |                 |



### **Ejemplo 10**

#### **Estudio de inmunización con las nanocápsulas de protamina cargadas con el antígeno de influenza H1N1**

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso de  $\alpha$  tocoferol. Se procedió a la asociación antígeno de HI en una relación 4:1 NC:HI. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 9.

La habilidad de las NC para inducir respuesta inmune fue medida en ratones hembras BALB/c, la respuesta fue cuantificada a través de ELISA los días 21, 35, 49 y 196. Los animales tuvieron ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con temperatura constante a 22°C, con agua y alimentos ad libitum. Los animales estuvieron consientes durante la inmunización y la toma de muestras. Los ratones fueron utilizados de acuerdo a las directrices de la normativa española (decreto real 1201/2005). Grupos de 5 ratones fueron elegidos al azar y fueron inmunizados con una dosis de 7,5 ó 2  $\mu$ g de antígeno adsorbido en las nanocápsulas de Pr, los días 0, 21, 35 por vía subcutánea y se evaluó la presencia de anticuerpos IgG específicos frente al antígeno mediante técnicas de ELISA. La figura 6, señala los resultados obtenidos para el estudio realizado.

Como se puede observar en la imagen, las NC Pr inducen títulos de inhibición de hemaglutinación mayores de una dilución de 1:64, que es considerado suficiente para la protección contra la infección de influenza.

**Ejemplo 11****Evaluación de la capacidad de adsorción de material genético a las nanocápsulas de protamina con núcleo de  $\alpha$  tocoferol**

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por  $\alpha$  tocoferol y como tensoactivo PEG estearato o PEG estearato y colato de sodio. Se procedió a la asociación de material genético EGFP-C1. El procedimiento de elaboración corresponde al procedimiento previamente descrito en el ejemplo 2.1, Posteriormente se incubó una alícuota del plásmido con las nanocápsulas de protamina ya formadas, teniendo para ello, diferentes relaciones de carga, al 5, 10 y 20 % respecto a la masa de Pr. Una vez incubadas las nanocápsulas con el pDNA adsorbido se evaluaron los parámetros diámetro medio de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (Tabla 24).

Como muestra la tabla 21, existe un descenso notable de la carga superficial de los sistemas, observándose incluso una inversión del potencial, ejemplo de que el material genético se encuentra adsorbido a la superficie de las NC Pr.

**Tabla 24**

| Formulación                                 | Tensoactivos                    | Size         | Pdl | Zeta        |
|---------------------------------------------|---------------------------------|--------------|-----|-------------|
| NC Pr $\alpha$ tocoferol                    | PEG estearato                   | 245 $\pm$ 11 | 0,2 | -8 $\pm$ 7  |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol (5% pDNA loading)  |                                 | 262 $\pm$ 16 | 0,2 | -14 $\pm$ 6 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol (10% pDNA loading) |                                 | 244 $\pm$ 3  | 0,2 | -20 $\pm$ 5 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol (20% pDNA loading) |                                 | 248 $\pm$ 4  | 0,2 | -15 $\pm$ 1 |
| NC NC Pr $\alpha$ tocoferol                 | PEG estearato y colato de sodio | 246 $\pm$ 2  | 0,1 | +33 $\pm$ 1 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol (5% pDNA loading)  |                                 | 238 $\pm$ 4  | 0,1 | -25 $\pm$ 3 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol (10% pDNA loading) |                                 | 240 $\pm$ 8  | 0,2 | -24 $\pm$ 2 |
| NC Pr $\alpha$ tocoferol (20% pDNA loading) |                                 | 276 $\pm$ 2  | 0,3 | -26 $\pm$ 1 |

**Ejemplo 12****Ejemplo 12.1 Evaluación del efecto la trehalosa y la glucosa sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas de protamina tras el proceso de liofilización**

- 5 Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por PEG estearato y escualeno, según el procedimiento previamente descrito. Se evaluó el efecto que tiene los agentes crioprotectores glucosa y trehalosa durante el proceso de liofilización de las nanocápsulas de Pr y en la posterior recuperación del tamaño de partícula tras la resuspensión ensayando dos concentraciones de crioprotector, 5 y 10% p/v. Asimismo, se evaluó la
- 10 influencia de la concentración de nanocápsulas (0,025; 0,05; 0,08; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; y 1% p/v) en la suspensión a liofilizar. Como control se liofilizo una suspensión de NC de Pr a una concentración de 1,54 % sin crioprotector. Los resultados de la Tabla muestran el tamaño de partícula de las nanocápsulas de Pr liofilizadas tras la resuspensión (Tabla 25).
- 15 Como se observa en la tabla 22, es posible obtener una formulación en seco de las NC Pr, la cual no pierde sus propiedades fisicoquímicas, inclusive sin el uso de crioprotector. Se sabe que las formulaciones en polvo seco poseen una mayor estabilidad que en suspensión acuosa, por ende se espera que dicha formulación pueda ser estable a T° ambiente.

20

**Tabla 25**

|          | Glucosa 5 % |     | Glucosa 10 %                  |     | Trehalosa 5% |     | Trehalosa 10 % |     |
|----------|-------------|-----|-------------------------------|-----|--------------|-----|----------------|-----|
| Conc. NC | Tamaño (nm) | PI  | Tamaño (nm)                   | PI  | Tamaño (nm)  | PI  | Tamaño (nm)    | PI  |
| 1,54 %   | 219 ± 83    | 0,3 | Formulación sin crioprotector |     |              |     |                |     |
| 1%       | 317 ± 66    | 0,4 | 273 ± 51                      | 0,4 | 330 ± 74     | 0,5 | 256 ± 39       | 0,4 |
| 0,75%    | 300 ± 67    | 0,4 | 628 ± 501                     | 0,6 | 320 ± 84     | 0,5 | 258 ± 45       | 0,3 |
| 0,50%    | 310 ± 52    | 0,4 | 415 ± 373                     | 0,4 | 320 ± 27     | 0,5 | 237 ± 31       | 0,3 |
| 0,25%    | 305 ± 44    | 0,4 | 259 ± 40                      | 0,4 | 303 ± 37     | 0,4 | 210 ± 46       | 0,3 |
| 0,10%    | 244 ± 30    | 0,3 | 254 ± 22                      | 0,3 | 285 ± 47     | 0,4 | 212 ± 27       | 0,3 |
| 0,08%    | 251 ± 56    | 0,4 | 226 ± 11                      | 0,3 | 229 ± 6      | 0,3 | 198 ± 39       | 0,2 |
| 0,05%    | 268 ± 41    | 0,4 | 279 ± 57                      | 0,3 | 204 ± 10     | 0,3 | 204 ± 33       | 0,2 |
| 0,025%   | 243 ± 37    | 0,3 | 217 ± 14                      | 0,3 | 184 ± 20     | 0,3 | 252 ± 68       | 0,3 |

Ejemplo 12.2 Evaluación del efecto la sobre el tamaño de partícula de las nanocápsulas de protamina y la integridad del rHBsAg tras el proceso de liofilización

Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por PEG  
 5 estearato, colato de sodio y  $\alpha$  tocoferol, según el procedimiento previamente descrito. Se  
 evaluó el efecto del tamaño de partícula de Las NC Pr a una concentración de 1 % y  
 utilizando los agentes crioprotectores glucosa y trehalosa, a una concentración del 5%. Los  
 resultados de la Tabla muestran el tamaño de partícula de las nanocápsulas de Pr liofilizadas  
 tras la resuspensión (Tabla 23) La integridad del antígeno adsorbido se analizó a través de  
 10 Western blot.

Como se observa en la tabla 26, es posible obtener una formulación en seco de las NC Pr con  
 el antígenos rHBsAg adsorbido a su cubierta, la cual no pierde sus propiedades  
 fisicoquímicas. La imagen muestra la integridad del antígeno rHBsAg asociado a las NC-Pr  
 15 luego del proceso de liofilización.

Las imagen de Western blot muestra que no existe degradación tras el proceso de  
 liofilización.

**Tabla 26**

20

| Formulación          | Concentración<br>NC (% p/p) | Crioprotector | Tamaño        | PDI |
|----------------------|-----------------------------|---------------|---------------|-----|
| NC Pr sin liofilizar | 1.64                        |               | 268 $\pm$ 35  | 0,2 |
| NC Pr Liofilizadas   | 0,5                         | Trehalosa     | 228 $\pm$ 43  | 0,3 |
| NC Pr Liofilizadas   | 1                           | Trehalosa     | 188 $\pm$ 7   | 0,3 |
| NC Pr Liofilizadas   | 1                           | Glucosa       | 254 $\pm$ 109 | 0,3 |

**Ejemplo 13**Evaluación de la variación del tamaño de partícula de la formulación de nanocápsulas de protamina durante su almacenamiento

- 5 Se prepararon nanocápsulas de protamina, un núcleo oleoso compuesto por  $\alpha$  tocoferol y PEG-st, según el procedimiento previamente descrito en el ejemplo 2.3, con 12 mg de PEG-st. Se realizaron medidas de tamaño de partícula durante un largo periodo de tiempo, con el fin de obtener información acerca de la evolución del tamaño del sistema con el tiempo. Asimismo se evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento (4-8 °C) sobre la
- 10 estabilidad de las nanocápsulas. Los resultados presentados en la tabla 27 muestran la escasa variabilidad del tamaño de las nanocápsulas de Pr, durante el almacenamiento.

**Tabla 27**

| Tiempo  | Tamaño       |
|---------|--------------|
| Día 0   | 261 $\pm$ 13 |
| Día 7   | 261 $\pm$ 7  |
| Día 14  | 263 $\pm$ 10 |
| Día 21  | 258 $\pm$ 8  |
| Día 28  | 265 $\pm$ 7  |
| 2 meses | 270 $\pm$ 12 |
| 3 meses | 300 $\pm$ 15 |
| 4 meses | 289 $\pm$ 18 |

#### **Ejemplo 14**

##### Evaluación de la viabilidad celular de las nanocápsulas de protamina

Con el fin de evaluar la viabilidad de las nanocápsulas de protamina en células  
 5 inmunes RAW 264,7. Para ello se prepararon las nanocápsulas de protamina según el  
 procedimiento descrito en el ejemplo 2.1 con aceite  $\alpha$  tocoferol (TCPH) y escualeno (SQL).  
 Para este estudio se incubaron diferentes concentraciones de nanocápsulas en la línea celular  
 mencionada y luego de 24 ó 48 horas se cuantifico su viabilidad a través del método de QCCS  
 (del ingles Quick Cell Countig Solution).

10

Como muestra en la figura 5 a diferentes concentraciones de nanocápsulas de protamina, la  
 viabilidad se encuentra sobre el 75% incluso tras 48 horas de incubación, lo que nos entrega  
 los valores de toxicidad de la invención

15

20

25

30

## **Reivindicaciones**

1. Un sistema nanocapsular adecuado para la administración de ingredientes activos, que comprende:
  - 5           a. Una capa superficial que comprende el polipéptido protamina;
  - b. Un núcleo oleoso;
  - c. Un tensoactivo caracterizado por tener una relación hidrofílica-lipofílica (balance hidrófilico-lipofílico (HLB)) superior a 8 con la condición de que dicho tensoactivo no es un fosfolípido; y
  - 10          d. opcionalmente al menos un principio activo.
  
2. El sistema nanocapsular según la reivindicación 1, en donde el tensoactivo se selecciona de la lista que consiste en monooleato de sorbitán polioxietilénico, monoláurato de sorbitan polioxietilénico, monoestearato de polioxietilensorbitano, 15           monooleato de polioxietilensorbitano, triestearato de polioxietilensorbitano, trioleato de polioxietilensorbitano, monolaurato de polioxietilensorbitano, monoestearato de polietilenglicol, estearato de polietilenglicol, dilaurato de polietilenglicol, monopalmitato de polietilenglicol, polietilenglicol estearato, Poloxamer 124, Poloxamer 188, Poloxamer 237, Poloxamer 338, Poloxamer 407, oleato de 20           trietanolamonio, oleato sódico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, lauril sulfato sódico, oleato de irietanolamina, goma tragacanto y dodecilsulfato sódico ó cualquier combinación de los mismos.
  
3. El sistema nanocapsular según la reivindicación 2, donde el tensoactivo se 25           selecciona de la lista que consiste en oleato de trietanolamonio, oleato sódico, colato

de sodio, deoxicolato de sodio, lauril sulfato sódico, oleato de irietanolamina, goma tragacanto y dodecilsulfato sódico ó cualquier combinación de los mismos.

4. El sistema nanocapsular según la reivindicación 2, donde el tensoactivo es colato de sodio, polietilenglicol estearato, monooleato de sorbitán polioxietilénico, monoláurato de sorbitan poli oxietilénico ó cualquier combinación de los mismos.

5. El sistema nanocapsular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el núcleo lipófilo oleoso se selecciona de la lista que consiste en aceite de cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma,  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno o cualquier combinación de los mismos.

6. El sistema nanocapsular de acuerdo con la reivindicación 5, donde el núcleo lipófilo oleoso se selecciona de la lista que consiste en escualeno ó  $\alpha$  tocoferol.

7. El sistema nanocapsular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sistema comprende un principio activo de naturaleza lipófila o hidrófila.

8. El sistema nanocapsular según la reivindicación 7, donde el principio activo se selecciona de la lista que consiste en docetaxel, antígenos recombinantes de la hepatitis B, antígenos de la influenza (H1N1), ácidos nucleicos, compuestos sacarídicos, péptidos, proteínas ó cualquier combinación de los mismos.

9. El sistema nanocapsular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se encuentra liofilizado.



10. El sistema nanocapsular según la reivindicación 8, donde el principio activo es docetaxel.

11. El sistema nanocapsular según la reivindicación 8, donde el principio activo es el  
5 antígeno recombinante de la hepatitis B (rHBsAg).

12. El sistema nanocapsular según la reivindicación 8, donde el principio activo es el antígeno recombinante de la influenza H1N1 (HI).

10 13. Procedimiento de difusión de disolvente en una etapa para la obtención del sistema nanocapsular tal y como se define en la reivindicación 1, que comprende:

- a. preparar una disolución acuosa que comprende protamina;
- b. preparar una disolución orgánica que comprende un aceite y uno o más  
15 tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8;
- c. mezclar bajo agitación las disoluciones preparadas en las etapas a) y b) para obtener las nanocápsulas; y
- d. opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos de la mezcla obtenida en la etapa anterior hasta volumen constante.

20 14. Procedimiento de difusión de disolvente en dos etapas para la obtención del sistema nanocapsular tal y como se define en la reivindicación 1, que comprende:

- a. preparar una disolución orgánica que comprende un aceite y uno o más  
25 tensoactivos caracterizados por tener una relación hidrofílica-lipofílica superior a 8;

- b. añadir la disolución obtenida en la etapa a) sobre una fase acuosa que opcionalmente contiene un tensoactivo soluble en agua y que está bajo agitación para formar una nanoemulsión;
- c. opcionalmente, evaporar total o parcialmente los disolventes orgánicos hasta volumen constante; y
- d. recubrir la nanoemulsión obtenida en la etapa anterior mediante un proceso de incubación con una disolución acuosa que comprenda protamina.

15. El procedimiento según la reivindicación 13 o 14, donde si el sistema nanocapsular comprende un ingrediente activo, éste se adiciona a la disolución orgánica si es lipofílico ó a la disolución acuosa si es hidrofílico.

16. Uso del sistema de la reivindicación 10, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón ó de páncreas.

17. Uso del sistema de la reivindicación 11, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la hepatitis B.

18. Uso del sistema de la reivindicación 12, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la influenza H1N1.

19. Composición farmacéutica que comprende el sistema nanocapsular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.