

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 554**

21 Número de solicitud: 201830339

51 Int. Cl.:

**A61K 47/36** (2006.01)

**A61K 31/357** (2006.01)

**A61K 31/122** (2006.01)

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/7048** (2006.01)

**A61P 33/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**05.04.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.11.2019**

Fecha de concesión:

**10.10.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**20.10.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)  
CTT-OTRI- CASA DEL ESTUDIANTE  
C/ REAL DE BURGOS, S/N  
47001 VALLADOLID (Valladolid) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN GIL, Jesús;  
ANDRÉS JUAN, Celia;  
RUIZ BEN, Eduardo y  
PÉREZ LEBEÑA, Eduardo**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE ORIGEN NATURAL Y BIODISPONIBLE PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE ORIGEN PARASITARIO**

57 Resumen:

Complejo de inclusión de origen natural y biodisponible para el tratamiento de enfermedades de origen parasitario.

Complejo de inclusión que comprende al menos un compuesto activo contra enfermedades parasitarias tal como la malaria, glucósido de esteviol y un aminoglucósido. En particular, los compuestos activos son artemisinina, un derivado de la misma, curcumina, hidroxitirosol o una combinación de los anteriores. La presente invención también se refiere a un método para obtener dicho complejo de inclusión mediante ultrasonidos; así como al complejo de inclusión para el tratamiento de enfermedades parasitarias, en particular, la malaria.

ES 2 731 554 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE ORIGEN NATURAL Y BIODISPONIBLE PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE ORIGEN PARASITARIO

5

#### SECTOR TÉCNICO

La presente invención se encuadra en el ámbito de la química orgánica y halla su aplicación en el sector farmacéutico. De forma más específica, la presente invención proporciona un nuevo complejo, en particular un complejo de inclusión o clatrato, que permite incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos incluidos en su interior. Como resultado, cuando los compuestos activos presentan actividad antiparasitaria, el complejo de la presente invención permite el tratamiento de enfermedades parasitarias, tal como la malaria, con una actividad mayor que la obtenida de utilizarse los componentes por separado.

15

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los parásitos son seres vivos que viven de otros seres vivos, como del cuerpo humano, para alimentarse y tener un lugar donde vivir. Se pueden contraer por medio de los alimentos o el agua contaminada, la picadura de un insecto o por contacto sexual. Algunas enfermedades parasitarias son más fáciles de tratar que otras.

Los parásitos varían en tamaño, desde organismos unicelulares llamados protozoarios, hasta gusanos, que pueden observarse a simple vista. El suministro de agua contaminada puede causar infecciones por Giardias. Los gatos pueden transmitir toxoplasmosis, peligrosa para las mujeres embarazadas. Otras enfermedades, como la malaria, son comunes en ciertas partes del mundo. En concreto esta última, denominada también paludismo, está producida por parásitos del género *Plasmodium* y es la primera en importancia entre las enfermedades debilitantes. Causó aproximadamente 216 millones de casos de paludismo el año 2016 y 445.000 fallecidos, de los cuales más del 85% son niños en zonas endémicas de África. La mayor parte de la carga de morbilidad se registra al sur del Sahara.

Los síntomas de la malaria son muy variados, incluyendo fiebre, escalofríos, sudoración y dolor de cabeza. Puede presentar náuseas, vómitos, tos, heces con sangre, dolores musculares, ictericia, defectos de la coagulación sanguínea, shock, insuficiencia renal o

hepática, trastornos del sistema nervioso central y coma. La fiebre y los escalofríos son síntomas cíclicos, repitiéndose cada dos o tres días.

5 El protozoo *Plasmodium falciparum* causa la malaria más aguda y grave. Origina el secuestro de hematíes en microcirculación venosa, evita el paso de la sangre por el bazo y, por tanto, provoca su destrucción; presenta alteraciones en el nivel de conciencia, coma, convulsiones, hipoglucemia, hiperinsulinemia en adultos, acidosis metabólica, ictericia o hemorragias que son signos de mal pronóstico que requieren una actuación médica inmediata. La enfermedad es grave en niños y mujeres embarazadas.

10

Los medicamentos antipalúdicos varían de país a país, debido a estudios de resistencia a antimaláricos que se realizan de manera periódica y de acuerdo a un protocolo establecido por la agencia local de la OMS. Se han observado resistencias de los parásitos a varios antipalúdicos. Las tasas de resistencia aumentan a medida que el uso de nuevos antipalúdicos también aumenta. Dentro de los medicamentos habitualmente usados destacan los derivados de la artemisinina, ya que presentan acción esquizotónica sanguínea rápida. La artemisinina se encuentra en la planta *Artemisia annua*. Se trata de una lactona sesquiterpénica que contiene un puente peróxido inusual. Este peróxido parece ser el responsable del mecanismo de acción de la droga. Los derivados de artemisinina forman una familia de fármacos y poseen la acción más rápida de todos los medicamentos comunes contra el paludismo. Adicionalmente, se han descrito otros compuestos terpénicos con características antimaláricas, como es el caso de los denominados Mogrosidos.

15

Debido a la corta vida media de la artemisinina, se debe usar en combinación con otro antimalárico para evitar recrudescencias de la infección. Así, su uso como monoterapia está desaconsejado por la OMS, ya que se ha encontrado que parásitos de malaria han desarrollado resistencia al fármaco. Las terapias que combinan la artemisinina con algún otro fármaco (ACTs), generalmente compuestos organoclorados, son los tratamientos preferidos por su efectividad, aunque presentan problemas de tolerancia por los pacientes. El uso de dicho medicamento se ha incrementado también en tratamientos contra la malaria vivax y es objeto de investigación en estudios de tratamientos del cáncer.

20

25

Por otra parte, es conocido que la curcumina tiene efectos antipalúdicos *in vitro*, pero su nula biodisponibilidad *in vivo* dificulta el desarrollo de combinaciones con la artemisinina. De hecho esta también adolece del mismo problema. En el estudio *Curcumin-Artemisinin*

30

*Combination Therapy for Malaria*, Govindarajan Padmanaban et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May, debido al hecho que estas sustancias no son solubles en agua, tienen que disolverlas en DMSO (dimetilsulfóxido), lo que no es practicable para realizar estudios *in vivo* con humanos. Otro inconveniente detectado en el artículo es que no se aplican simultáneamente por el mismo medio, sino que la artemisinina se inyecta en sangre y la curcumina, previamente disuelta en DMSO, se ha introducido oralmente.

En el estudio *Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite Plasmodium falciparum: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species*, Long Cui, Jun Miao, and Liwang Cui, *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb, donde se utiliza la curcumina como monoterapia, se describe el efecto generado de forma que la actividad prooxidante de la curcumina promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que finalmente inhiben la actividad de la histona acetiltransferasa (HAT) del parásito, provocando la citotoxicidad necesaria en el mismo.

En el estudio *Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy*, Kunal Jain, Sumeet Sood, K. Gowthamarajan, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Jul 2013, se describen hasta 9 blancos posibles del parásito sobre los que actúa la curcumina. Por otro lado, en el estudio *Ameliorative Effects of Curcumin on Artesunate-Induced Subchronic Toxicity in Testis of Swiss Albino Male Mice*, Desai KR, Rajput DK, Patel PB, Highland HN, *Dose Response*, 2015 Jun, se indica que la curcumina actúa atenuando el daño generado en el tratamiento de la malaria con un derivado de la artemisinina, el artesunato, que se encuentra en la Lista de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud.

Por otro lado, en la solicitud de patente WO2012127287 A2 (Febris Bio Tech Ltd et al.) se describe el uso de una composición que comprende glucósidos de esteviol para el tratamiento de la malaria. Adicionalmente, esta composición puede comprender otros agentes antipalúdicos tal como la artemisinina o uno de sus derivados.

Para garantizar que el compuesto activo ingerido tenga un aprovechamiento por parte del cuerpo y sea útil para el fin pretendido, es esencial que éste tenga una adecuada biodisponibilidad. Lamentablemente, la administración de medicamentos por vía oral a menudo sufre de problemas de solubilidad y/o permeabilidad, así como también son frecuentes los problemas de estabilidad que limitan la vida útil del compuesto con actividad

5 terapéutica. El uso de nanocompuestos de inclusión para mejorar la biodisponibilidad de sustancias no solubles en agua es un campo de gran amplitud y en continuo progreso tecnológico, aplicable a las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. Estas técnicas necesitan evolucionar para satisfacer las nuevas demandas de los consumidores y de la Ciencia de forma general.

10 En el estado de la técnica se han descrito varios intentos de encapsular compuestos con actividad frente a la malaria con objeto de aumentar su solubilidad. En particular, se ha descrito la formación de complejos con ciclodextrinas (US2010179103 A1, WO03075904 A2 y Suvarna Vasanti y col. (*Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. Biomedicine & Pharmacotherapy*. Abril 2007. Vol. 88, páginas 1122-1144)); con liposomas (Isacchi Benedetta y col. (*Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: Enhanced antimalarial efficacy against Plasmodium berghei-infected mice*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Abril 2012, Vol. 80, N° 3, 15 páginas 528-534)) y con lípidos (Memvanga Patrick B et col. (*An oral malaria therapy: Curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with beta-arteether*, Journal of Controlled Release, Dic 2013, Vol. 172, N° 3, páginas 904-913)).

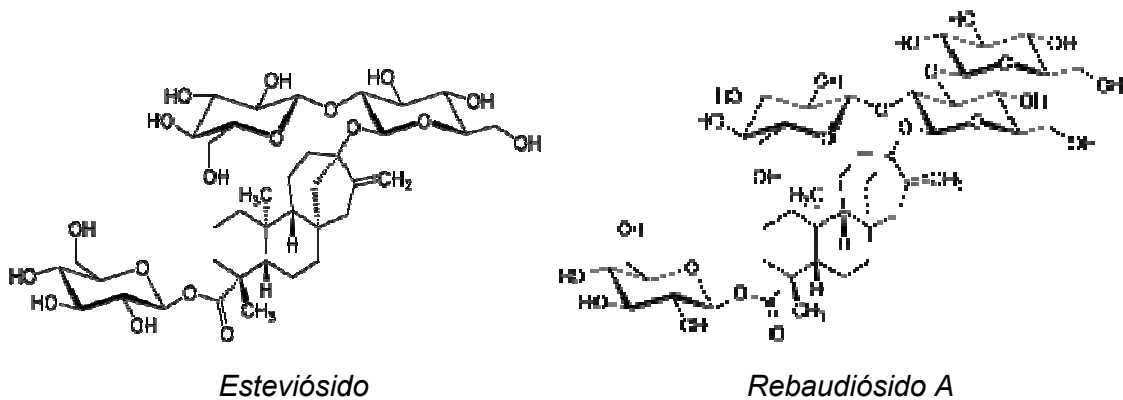
20 Por otro lado, en la solicitud de patente WO2009126950 A2 (Univ Louisiana State & Agricultural and Mechanical College) se describe la utilización de glucósidos de diterpenos para aumentar la solubilidad de sustancias insolubles en agua tal como la curcumina o la artemisinina, por separado.

## 25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

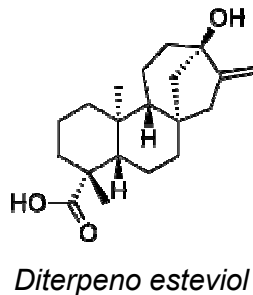
Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un complejo, en particular un complejo de inclusión o clatrato, que comprende al menos un compuesto activo, un glucósido de esteviol (GL) y un aminoglucósido (AM).

30 En este documento debe entenderse como “compuesto activo” cualquier compuesto que presente una actividad terapéutica beneficiosa para el ser humano o los animales. En particular, este término hace referencia a un compuesto con actividad antiparasitaria y, preferentemente, con actividad antipalúdica.

El complejo que aquí se describe puede comprender uno o varios glucósidos de esteviol diferentes. Los glucósidos de esteviol más importantes son esteviósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido. Mientras que la molécula de esteviósido es un complejo de tres moléculas de glucosa y una molécula de aglicona llamada esteviol, la molécula de rebaudiósido A contiene un total de cuatro unidades de glucosa, con la glucosa media del triplete conectado a la estructura central de esteviol.



10



15 Generalmente, el complejo de inclusión que aquí se describe comprende glucósidos de esteviol, por ejemplo procedentes de la estevia, con pesos moleculares comprendidos entre 800 a 1000 g/mol.

Preferentemente, el aminoglucósido (AM) se selecciona entre oligómero de quitosano, glucosamina y una combinación de los anteriores. En realizaciones aún más preferidas, el peso molecular del oligómero de quitosano es de 1000 a 10000 g/mol y, aún más preferentemente, entre 1000 a 3000 g/mol.

Un aspecto importante de la presente invención (constatado por DRX, DSC y SEM) es que las interacciones entre los componentes del complejo de inclusión son más débiles que las

25

mostradas con otros complejos como los formados por ciclodextrinas, ya que el tamaño del complejo es superior. En particular, las interacciones entre los glucósidos de esteviol, aminoglucósidos y los compuestos activos en el complejo de la invención, obtenidos mediante sonicación por ultrasonidos tal como se describe más adelante en este documento, tienen lugar mediante puentes de hidrógeno. El enlace de hidrógeno es una fuerza electrostática fuerte cuando muchas moléculas están unidas, ya que proporciona gran estabilidad, pero más débil que el enlace covalente o el enlace iónico. En consecuencia, los compuestos de la presente invención presentan mayor capacidad de liberación de los compuestos activos que la que pudiera obtenerse con ciclodextrinas.

10

En la aparición de los enlaces mediante puentes de hidrógeno es esencial la acción de los ultrasonidos que se aplican. De lo contrario, estos enlaces no aparecen o lo hacen de forma muy lenta, inviabilizando el proceso que se describe en esta patente.

15 El complejo de inclusión que se describe en este documento presenta ventajas frente a otros sistemas de vehiculización por permitir incrementar la solubilidad de los compuestos incluidos en su interior, permitir su almacenamiento y su administración, facilitando así su aplicación en el sector farmacéutico. Otra importante ventaja de este complejo radica en el uso exclusivo de polímeros naturales y en la no utilización de surfactantes.

20

Así, la combinación de glucósido de esteviol y aminoglucósido como agentes formadores del complejo de la invención proporciona una elevada solubilidad (que puede llegar a ser 1000 veces superior a la del compuesto activo por separado) y estabilidad en solución. Se ha observado que el complejo de inclusión formado únicamente con glucósido de esteviol como agente encapsulante precipita con el tiempo. La adición del aminoglucósido otorga estabilidad al complejo y, como consecuencia, se mantiene la solubilidad en agua durante un tiempo significativamente superior. De forma general, la contribución del aminoglucósido mejora el complejo de inclusión en dos vertientes diferentes, por una parte aumentando la solubilidad en agua que se había obtenido con el glucósido de esteviol y por otra dando una estabilidad adicional necesaria para que su vida útil sea mayor.

30

En realizaciones preferidas de la presente invención, el compuesto activo presente en el interior del complejo de inclusión es un compuesto con actividad frente a la malaria. Preferentemente, este compuesto se selecciona del grupo que consiste en artemisinina, un derivado de artemisinina, curcumina, hidroxitirosol y una combinación de los anteriores. En

35

particular, el derivado de artemisinina puede ser artemeter, artesunato, o dihidroartemisinina (DHA).

5 La inclusión de la artemisinina en el complejo de inclusión que se describe en este documento permite estabilizar el grupo peróxido presente en su estructura, lo que resulta beneficioso de cara a utilizar este compuesto activo en el tratamiento de la malaria, ya que se intuye que este grupo funcional es particularmente activo frente a los agentes causantes de la infección, al inducir un proceso oxidativo en las membranas celulares de los mismos, lo que provoca la fagocitosis y posterior lisis.

10

Preferentemente, en el interior del complejo formado por glucósido de esteviol y aminoglucósido se sitúan dos agentes antipalúdicos, siendo uno de ellos artemisinina o uno de sus derivados, en particular, artemeter, artesunato, o dihidroartemisinina; mientras que el segundo compuesto activo se selecciona entre curcumina y hidroxitirosol.

15

Una de las ventajas del complejo de inclusión que aquí se describe es que tanto el glucósido de esteviol como el aminoglucósido, agentes encapsulantes del complejo, son compuestos de origen natural que muestran actividad frente a la malaria. Como consecuencia, este complejo resulta particularmente útil para el tratamiento de dicha enfermedad. Así, en el caso de utilizarse una combinación de dos compuestos activos tal como se menciona en el párrafo anterior, la utilización del complejo de la presente invención para el tratamiento de la malaria tiene lugar mediante la aplicación de cuatro compuestos con actividad antimalárica, es decir, la presente invención proporciona una tetraterapia para el tratamiento de la malaria. Es significativo que la presencia de un polifenol como la curcumina en el complejo de la presente invención, evita la recrudescencia, es decir, la aparición de la enfermedad en el futuro.

20

25

Adicionalmente, la curcumina y el hidroxitirosol son ambos compuestos fenólicos con un comportamiento muy similar. En particular, ambos pueden actuar como hepatoprotectores, lo que resulta particularmente ventajoso en el tratamiento de la malaria, ya que se conoce que durante dicho tratamiento el protozoo se acumula en el hígado.

30

En realizaciones aún más preferidas, el complejo de inclusión que se describe en esta solicitud de patente comprende:

35 i) entre 10 % y 90 % de artemisinina o uno de sus derivados, y



ii) entre 90% y 10 % de curcumina o hidroxitirosol;  
cantidades expresadas en peso respecto al peso total de los compuestos activos i) y ii)  
situados en el interior del complejo de inclusión.

5 En particular, se prefiere que el complejo de inclusión comprenda:

i) entre 35 % y 65 % de artemisinina o uno de sus derivados, y

ii) entre 65% y 35 % de curcumina o hidroxitirosol;

cantidades expresadas en peso respecto al peso total de los compuestos activos i) y ii)  
situados en el interior del complejo de inclusión.

10

La solubilidad de los compuestos activos (CBA) se incrementa con la concentración de  
glucósido de esteviol (GL), siendo preferible que la relación entre CBA y GL sea entre 1:6 y  
1:10. Así, se considera preferible que la relación en peso entre los diferentes componentes  
del complejo sea de 1:6:1 a 1:10:1 entre el CBA: GL: AM, siendo la relación óptima de 1  
15 compuesto activo (CBA): 6 glucósido de esteviol (GL): 1 de aminoglucósido (AM), ya que  
esta relación permite la formación de estructuras supramoleculares o toroides de clatratos  
en los que el compuesto activo queda atrapado por interacciones moleculares muy débiles o  
de corto alcance con la molécula de glucósido de esteviol, por ejemplo, esteviosido (ver  
figura 1). Si se incrementa la concentración de glucósido de esteviol y/o aminoglucósido se  
20 puede incrementar la solubilización del compuesto activo, pero ello también implica un  
mayor gasto económico al utilizar una cantidad mayor de los agentes formadores del  
complejo.

20

Preferentemente, el compuesto activo comprendido en el interior del complejo es una  
25 combinación de artemisinina o uno de sus derivados con curcurmina o hidroxitirosol. En  
particular, se prefiere que el compuesto activo sea la combinación de artemisinina y  
curcumina (ART/CUR) siendo aún más preferente que estos compuestos se encuentren en  
una relación 1:1 en peso entre ellos. Tal como se muestra en la figura 1, cuando el  
compuesto activo es la combinación de artemisinina (ART) y curcumina (CUR) en una  
30 relación 1:1 en peso, se puede formar un agregado co-amorfo, tal como ha sido propuesto  
por Kuthuru Suresh, M. K. Chaitanya Mannava, and Ashwini Nangia\*, A Novel Curcumin-  
Artemisinina Coamorphous Solid: Physical Properties and Pharmacokinetic Profile en RSC  
Advances (publicación online).

Un segundo aspecto de la presente invención hace referencia a un método para obtener los complejos descritos anteriormente, donde el método comprende las siguientes etapas:

5 a) mezclar mediante sonicación por ultrasonidos al menos un compuesto activo a encapsular (CBA) con un glucósido de esteviol (GL), preferentemente en un medio hidroalcohólico;

b) añadir un aminoglucósido (AM) a la solución obtenida en la etapa anterior y mezclar mediante sonicación por ultrasonidos; y

10 c) aislar el complejo CBA-GL-AM formado en la etapa b) en estado sólido, preferentemente mediante liofilización.

15 Preferentemente, la mezcla por sonicación en las etapas a) y b) tienen lugar entre 10 a 20 kHz, siendo el valor óptimo de 20 kHz. En realizaciones particulares de la presente invención, estas etapas tienen lugar a una temperatura entre 15 y 50°C, más preferiblemente entre 20 y 40°C. Para controlar que la temperatura de la solución no supere los 50°C, la aplicación de ultrasonidos puede realizarse de forma intermitente, por ejemplo, en periodos de aplicación de 2 minutos cada uno. En la solución hidroalcohólica el alcohol puede ser metanol o etanol, y la relación alcohol: agua puede ser 1:1 (v/v).

20 De forma adicional, el método puede comprender una etapa c1), donde el tamaño de particular del complejo de inclusión CBA: GL: AM obtenido en la etapa c) se reduce a un tamaño de partícula entre 200 nm y 400 nm, preferentemente mediante un proceso de trituración o molienda.

25 El complejo CBA-glucósido de esteviol formado en la etapa a) puede aislarse en estado sólido, por ejemplo, por liofilización de la solución. Este aislamiento puede realizarse directamente, sin necesidad de ajustar el pH. Generalmente, este complejo CBA-GL aislado ya presenta una mayor estabilidad solubilidad al agua que el compuesto activo sin encapsular. Sin embargo, la incorporación de otra esfera de encapsulación formada por aminoglucósidos, en particular oligómero de quitosano, mejora significativamente su solubilidad en agua, a la vez que mejora el control de liberación del CBA y, en consecuencia, su biodisponibilidad y absorción.

30 En aquellas realizaciones en las que el complejo CBA-glucósido se aísla en estado sólido, el método puede comprender una etapa adicional, donde el tamaño de partícula de este

complejo aislado se reduce hasta entre 20 nm y 200 nm, preferentemente mediante un proceso de trituración o molienda.

5 Mediante un proceso de sonicación en la etapa a) del método, es decir, la aplicación directa de ultrasonidos sobre la solución que comprende la mezcla de CBA y glucósidos de esteviol, preferentemente en medio hidroalcohólico, las moléculas de glucósido se orientan en torno a compuesto activo a encapsular, con interacciones débiles por formación de enlaces de hidrógeno entre los glucósidos. Posteriormente, el proceso de sonicación en presencia de aminoglucósido de la etapa b) permite formar una esfera de encapsulación adicional, dando  
10 lugar al complejo de inclusión CBA-GL-AM mediante aislamiento en estado sólido, preferentemente liofilización. El tamaño de las nanopartículas puede controlarse por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y/o microscopía electrónica de barrido (SEM) y la fuerza de los enlaces o interacción entre los grupos funcionales se puede hacer por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR-ATR). La caracterización de la  
15 cristalinidad del complejo obtenido se puede seguir por calorimetría de barrido diferencial (DSC) o bien difracción de rayos X (DRX). Los estudios de solubilidad y caracterización de los CBA pueden seguirse con un espectrofotómetro de UV-VIS y/o un cromatógrafo-masas (HPLC- Masas).

20 La solubilidad de los CBA en el complejo de la invención se incrementa con la concentración de glucósidos. Así, en la presente invención se prefiere que la relación CBA: glucósidos de esteviol se encuentre entre 1:6 y 1:10 (peso:peso), siendo aún más preferible que esta relación CBA: glucósidos sea 1:6 (peso:peso), ya que es con la que se consigue una solubilidad adecuada a un menor coste.

25

A modo de explicación teórica, pero sin carácter vinculante, en la figura 1 se representa un complejo formado por artemisinina y curcumina en relación 1:1 como compuesto activo (CBA), una primera esfera formada por glucósido de esteviol en una relación 1:6 (CBA:GL), que se caracteriza por la presencia de débiles interacciones mediante puentes de hidrógeno  
30 entre las moléculas que favorece la solubilización y posterior vehiculización de la artemisinina y la curcumina. Aunque no se muestra en la figura 1, el complejo de inclusión de la presente invención comprende sucesivas esferas de la coordinación o el auto-ensamble con aminoglucósidos, en particular oligómeros de quitosano. Este tipo de interacciones contrastan con las fuertes interacciones que aparecen entre las ciclodextrinas  
35 y los CBA (ibuprofeno) que dificultan su vehiculización (S. Pereva, T. Sarafska, S.

Bogdanova, T. Spassov, *Efficiency of "Cyclodextrin-Ibuprofen" inclusion complex formation, Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2016)) (Figura 2).

5 En realizaciones preferidas de la presente invención, el método para obtener el complejo de inclusión que aquí se describe comprende mezclar mediante sonicación entre 10 kHz y 20 kHz, el complejo CBA: GL con al menos un aminoglucósido, preferiblemente oligómeros de quitosano, en una solución hidroalcohólica. Seguidamente, por *liofilización* de las soluciones hidroalcohólicas (directamente y sin ajustar el pH), se puede aislar el complejo CBA-GL-AM que posteriormente es sometido a *molienda*, de forma que el complejo resultante presenta  
10 un tamaño de las nanopartículas inferior a 400 nm.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al complejo de inclusión obtenible por el método que se describe en este documento.

15 La presente invención también se refiere al complejo de inclusión que se describe en esta solicitud de patente para su uso en medicina y, en particular, para el tratamiento de una enfermedad parasitaria tal como la malaria.

En particular, cuando el complejo comprende una combinación de artemisinina o uno de sus  
20 derivados, con curcumina o hidroxitirosol, la presente invención proporciona un complejo de inclusión que puede utilizarse como tetraterapia frente a la malaria, ya que los cuatro ingredientes que comprenden el complejo presentan actividad antipalúdica, dificultando así que se generen resistencias. Adicionalmente, todos los ingredientes del complejo no presentan los problemas de tolerancia asociados a la mayoría de terapias actualmente  
25 disponibles frente a la malaria.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: Modelo teórico no vinculante de la formación de un complejo de inclusión o clatrato  
30 entre esteviósido y artemisinina-curcumina (ART-CUR), con estequiometría 6 EST: 1 ART-CUR.

Figura 2: Formación de complejos toroide de  $\beta$ -ciclodextrina con ibuprofeno.

Figura 3. Espectros FTIR-ATR de absorbancia de los productos de partida (ordenados los espectros de arriba hacia abajo): 1º artemisinina (ART); 2º curcumina (CUR); 3º oligómeros de quitosano (OQ); 4º esteviósido (ES).

5 Figura 4. Espectros FTIR-ATR de absorbancia de los complejos de inclusión obtenidos por liofilización (ordenados los espectros de arriba hacia abajo): 1º artemisinina + curcumina (ART/CUR); 2º artemisinina + curcumina + esteviósido (ART/CUR-ES); 3º artemisinina + curcumina + esteviósido + oligómeros de quitosano (ART/CUR-ES-OQ); 4º complejo encapsulado centrifugado y lavado de oligómeros de quitosano con artemisinina +  
10 curcumina + esteviósido (ART/CUR-ES-OQ).

Figura 5. Fotografía obtenidas por microscopía con 500x de los compuestos triturados en molino de bolas: artemisinina (fig. 5a); artemisinina + curcumina 1:1 peso (fig. 5b); artemisinina + curcumina + esteviósido 0,5:0,5:3 en peso (fig. 5c); artemisinina + curcumina  
15 + esteviósido + oligómeros de quitosano 0,5:0,5:3:1 en peso (fig. 5d).

Figura 6: Fotografía obtenidas por microscopía con 500x de los compuestos precipitados y centrifugados de coproductos amorfos: artemisimina + curcumina + esteviósido + oligómeros quitosano 0,5:0,5:6:1 en peso.  
20

Figura 7: Espectros de DRX de artemisinina y curcumina (espectro superior, M8) y más abajo evolución del espectro de DRX de las mezclas de artemisinina y curcumina con esteviósido y oligómeros de quitosano (espectros inferiores, en orden descendente M7, M6 y M5) y por último (M3-1) la formación del complejo de inclusión encapsulado y liofilizado y  
25 completamente amorfo y soluble en agua de artemisinina + curcumina + esteviósido + oligómeros quitosano (0,5:0,5:6:1).

## EJEMPLOS

### 30 A. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

**Ejemplo 1.- Preparación del complejo (ART/CUR-ES-OQ) que comprende artemisinina y curcumina como compuesto activo (ART/CUR) hidrofóbico con esteviósido (ES) y oligómero de quitosano (OQ) en una relación en peso: 1 ART/CUR: 10 ES: 1 OQ**

35

**Apartado 1:** Se parte de 1 gramo de compuesto activo (artemisinina 0,5 g y curcumina 0,5 g) y se dispersan en 250 ml de etanol absoluto. Por otro lado, se pesan 10 g de esteviósido en 250 mL de agua destilada y desionizada. Se mezclan ambas soluciones y la mezcla resultante se emulsiona introduciendo directamente en la solución el cabezal del sonicador del equipo de ultrasonidos (frecuencia de 20 kHz). La sonicación se lleva a cabo durante periodos de 2 minutos cada uno, y un tiempo de 20 minutos, no dejando que la solución se caliente por encima de 50°C. La solución resultante, protegida de la luz, se filtra y/o centrifuga inmediatamente para retirar precipitados o impurezas y se guarda en frío 4-6 °C una noche. Posteriormente se liofiliza obteniéndose el complejo ART/CUR-ES. No se recomienda alterar el pH de la solución resultante para que no se formen precipitados no deseables.

**Apartado 2:** Se disuelven 1 g del complejo ART/CUR-ES obtenido según se describe en el apartado 1 en 100 mL de agua. Esta solución se adiciona sobre una solución de un polielectrolito de oligómeros de quitosano de bajo peso molecular 2000-10000 (100 mg), disperso en una solución de 100 mL de tripolifosfato 0,4% (p/v) y se sonica para obtener el complejo de inclusión ART/CUR-ES-OQ. Posteriormente, se centrifuga este complejo y se lava varias veces con agua destilada y desionizada, dando como resultado nanopartículas de ART/CUR-ES-OQ con un diámetro promedio entre 200 a 400 nm.

20

**Ejemplo 2.- Preparación del complejo (ART/HI-ES-OQ) que comprende artemisinina e hidroxitirosol como compuesto activo (ART/HI) hidrofóbico con esteviósido (ES) y oligómero de quitosano (OQ) en una relación en peso: 1 ART/HI: 6 ES: 1 OQ**

**Apartado 1:** Se parte de 1 gramo de compuesto activo (artemisinina 0,5 g e hidroxitirosol 0,5 g) y se dispersan en 250 ml de etanol absoluto. Por otro lado, se pesan 6 g de esteviósido en 250 mL de agua destilada y desionizada. Se mezclan ambas soluciones y la mezcla resultante se emulsiona introduciendo directamente en la solución el cabezal del sonicador del equipo de ultrasonidos (frecuencia de 20 kHz). La sonicación se lleva a cabo durante periodos de 2 minutos cada uno, y un tiempo de 20 minutos, no dejando que la solución se caliente por encima de 50°C. La solución resultante, protegida de la luz, se filtra y/o centrifuga inmediatamente para retirar precipitados o impurezas y se guarda en frío 4-6 °C una noche. Posteriormente se liofiliza obteniéndose el complejo ART/HI-ES. No se recomienda alterar el pH de la solución resultante para que no se formen precipitados no deseables.

35

**Apartado 2:** Se disuelven 1 g del complejo ART/HI-ES obtenido según se describe en el apartado 1 en 100 mL de agua. Esta solución se adiciona sobre una solución de un polielectrolito de oligómeros de quitosano de bajo peso molecular 2000-10000 (100 mg), disperso en una solución de 100 mL de tripolifosfato 0,4% (p/v) y se sonica para obtener el complejo de inclusión ART/HI-ES-OQ. Posteriormente, se centrifuga este complejo y se varias veces con agua destilada y desionizada, dando como resultado nanopartículas de ART/HI-ES-OQ con un diámetro promedio entre 200 a 400 nm.

## 10 **B. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE LA INVENCIÓN**

A continuación se incluye la caracterización de varios complejos estudiados por distintos tipos de espectroscopía y microscopía. En particular, se han caracterizado los siguientes complejos de inclusión:

- 15 i. artemisinina: curcumina 1:1 (en peso),
- ii. artemisinina: curcumina: esteviosido 0,5:0,5:10 (en peso),
- iii. artemisinina: curcumina: esteviosido: oligómeros de quitosano 0,5:0,5:10:1 (en peso),
- iv. artemisinina: curcumina: esteviosido: oligómeros de quitosano (0,5:0,5:10:1)
- 20 en peso, complejo aislado centrifugado.

### ***1.- Caracterización mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada (ATR).***

25 Se ha analizado la pureza de los productos de partida mediante FTIR-ATR (figura 3) y, adicionalmente, se han analizado las mezclas binarias-ternarias y cuaternarias de los complejos de inclusión (i) a (iv) (figura 4).

Las mayores diferencias se presentan para la formación de los complejos binarios, y especialmente se manifiesta la pérdida de cristalinidad de los productos de partida (artemisinina) y la formación de sólidos co-amorfos o complejos de inclusión o de auto-ensamblaje molecular.

En la figura 4 se muestran los espectros FTIR-ATR de absorbancia de los complejos de inclusión obtenidos por molienda y que se encuentran ordenados los espectros de arriba hacia abajo):

5 1º Artemisinina + Curcumina (ART: CUR) (parte superior de la figura 4). Se observa que se mantiene la cristalinidad de la artemisinina y de la curcumina, a pesar de haber sido sometido el material a trituración y/o molienda inferior a 50 micras. Puede observarse como los picos y sus alturas apenas han sufrido alteración en el compuesto binario, en relación con los productos de partida.

10

2º. Artemisinina + Curcumina + Estevióside (ART: CUR: ES) (parte central superior de la figura 4). El espectro FTIR muestra que el estevióside adicionado en la proporción 0,5:0,5:3 (ART: CUR: ES) en peso ha experimentado una disminución considerable en la intensidad y un incremento del ancho del pico o vibración de tensión C-O-C, lo que implica un aumento considerable del grado de carácter amorfo y la formación de co-productos amorfos.

15

3º. Artemisinina + Curcumina + Estevióside + Oligómeros de Quitosano (ART: CUR: ES: OQ). El espectro FTIR muestra que los productos mezclados en la proporción 0,5:0,5:3:1 (ART: CUR: ES: OQ) experimenta un mayor aumento del carácter amorfo y al tiempo mejora la solubilidad del nuevo complejo.

20

4º Complejo encapsulado de Oligómeros de Quitosano con Artemisinina + Curcumina + Estevióside (Art+Cur+Estev). El espectro FTIR del complejo liofilizado muestra un incremento notable del carácter amorfo, y de un grado similar al complejo 3º.

25

## **2.- Caracterización mediante Microscopía de los nuevos complejos**

En las figura 5 se muestran mediante técnicas de microscopía la evolución de los compuestos de partida, especialmente artemisinina (compuesto cristalino, figura 5a) a compuestos binarios como artemisinina + curcumina (1:1) peso (figura 5b), ternarios o mezclas trituradas artemisinina + curcumina + estevióside (0,5:0,5:6) peso (figura 5c); y cuaternarios o mezclas de artemisinina + curcumina + estevióside + oligómeros de quitosano (0,5:0,5:6:1) peso (figura 5d) cada vez más amorfos y más solubles en agua.

30



La formación de compuestos de inclusión o de autoensamble facilita e incrementa extraordinariamente la biodisponibilidad de los CBA, debido a las interacciones inter e intramoleculares por enlaces de hidrógeno entre la molécula de esteviósido y el CBA (Artemisinina-Curcumina).

5

En las figuras 6a y 6b se pueden observar las imágenes con 500x de los precipitados centrifugados de co-productos amorfos: 5º Artemisinina + Curcumina + Esteviósido + Oligómeros Quitosano (0.5:0.5:6:1) (superior) y 6º Artemisinina + Curcumina + Esteviósido + Oligómeros Quitosano (0.5:0.5:6:1) (inferior).

10

En la figura 7 se puede observar los espectros de DRX de artemisinina y curcumina altamente cristalinos e insolubles en agua (espectro superior) y más abajo se observa la evolución del espectro de DRX de las mezclas con esteviósido y oligómeros de quitosano (espectros de la zona media, cada vez más amorfos) y por último la formación del complejo de inclusión encapsulado y liofilizado y completamente amorfo y soluble en agua de Artemisinina + Curcumina + Esteviósido + Oligómeros Quitosano (0.5:0.5:6:1) (espectro de DRX inferior).

15

20

## REIVINDICACIONES

- 1.- Complejo de inclusión que comprende al menos un compuesto activo, un glucósido de esteviol y un aminoglucósido.
- 5
- 2.- Complejo de inclusión según la reivindicación 1, donde el aminoglucósido se selecciona del grupo que consiste en oligómero de quitosano, glucosamina y una combinación cualquiera de los anteriores.
- 10
- 3.- Complejo de inclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el compuesto activo se selecciona del grupo que consiste en artemisinina, un derivado de artemisinina, curcumina, hidroxitirosol y una combinación de los anteriores.
- 4.- Complejo de inclusión según la reivindicación 3, que comprende una combinación de
- 15
- compuestos activos i) y ii), donde:
- i) entre 10 % y 90 % de artemisinina o uno de sus derivados, y
  - ii) entre 90% y 10 % de curcumina o hidroxitirosol;
- cantidades expresadas en peso respecto al peso total de compuestos activos i) y ii).
- 20
- 5.- Complejo de inclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la relación entre el compuesto activo (CBA), el glucósido de esteviol (GL) y el aminoglucósido (AM) en el complejo es de 1:6:1 a 1:10:1 (CBA: GL: AM).
- 6.- Método para obtener el complejo de inclusión que se describe en una cualquiera de las
- 25
- reivindicaciones 1 a 5, donde el método comprende:
- a) mezclar mediante sonicación por ultrasonidos al menos un compuesto activo a encapsular (CBA) con un glucósido de esteviol (GL);
  - b) añadir un aminoglucósido (AM) a la solución obtenida en la etapa anterior y mezclar mediante sonicación por ultrasonidos; y
- 30
- c) aislar el complejo CBA-GL-AM formado en la etapa b) en estado sólido, preferentemente mediante liofilización.
- 7.- Método para obtener el complejo de inclusión según la reivindicación 6, donde las etapas a) y b) tienen lugar en un medio hidroalcohólico.

8.- Método para obtener el complejo de inclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, donde la sonicación tiene lugar entre 10 kHz y 20 kHz.

5 9.- Método para obtener el complejo de inclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende una etapa c1) donde el tamaño de partícula del complejo aislado en la etapa c) se reduce hasta entre 200 nm y 400 nm.

10.- Complejo de inclusión obtenido según el método que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

10

11.- Complejo de inclusión según una de las reivindicaciones 1 a 5 o 10 para su uso en medicina.

15 12. - Complejo de inclusión según una de las reivindicaciones 1 a 5 o 10 para el tratamiento de la malaria.

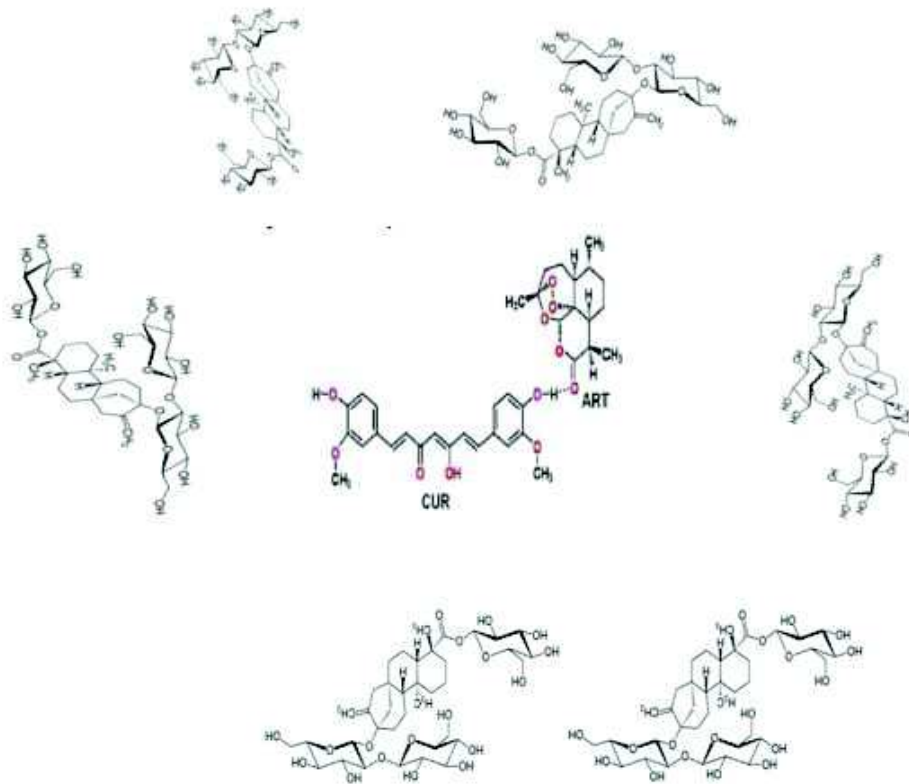


Figura 1

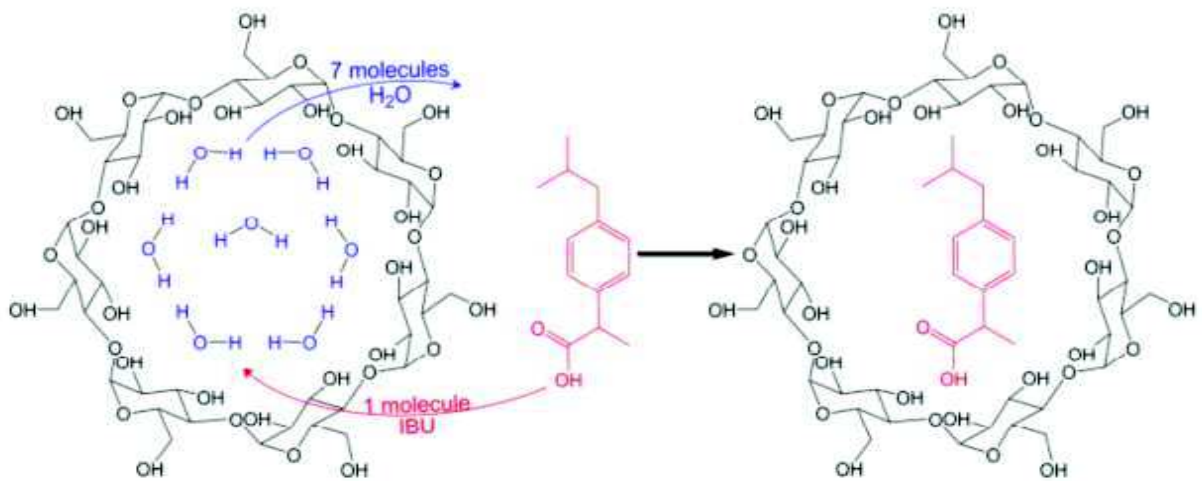


Figura 2

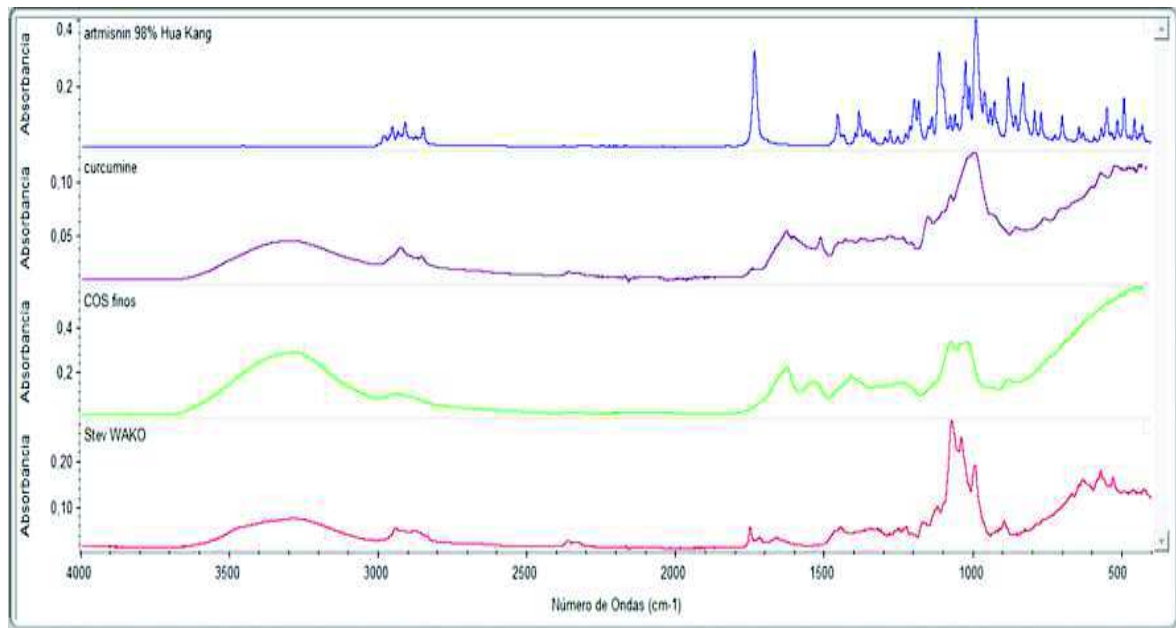


Figura 3

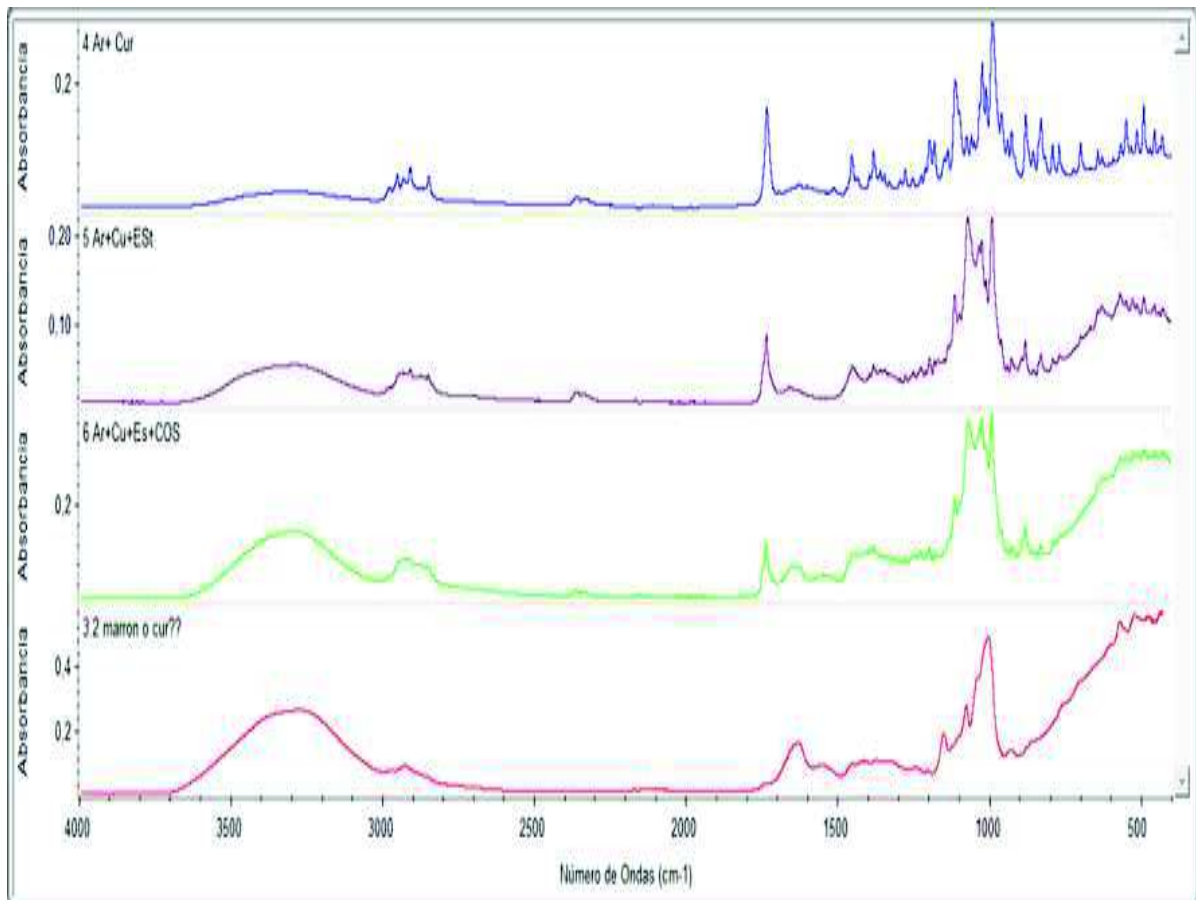
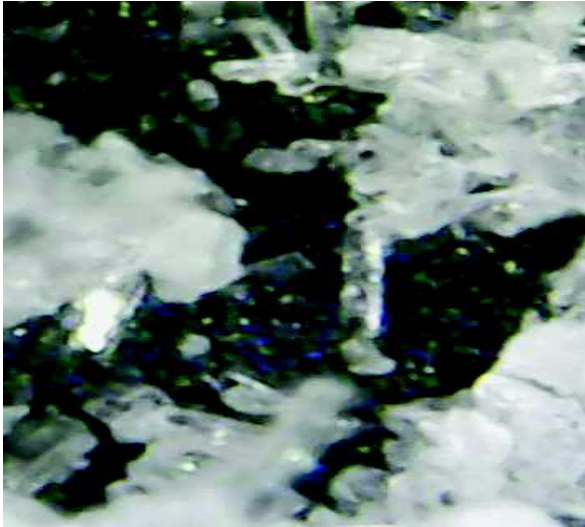
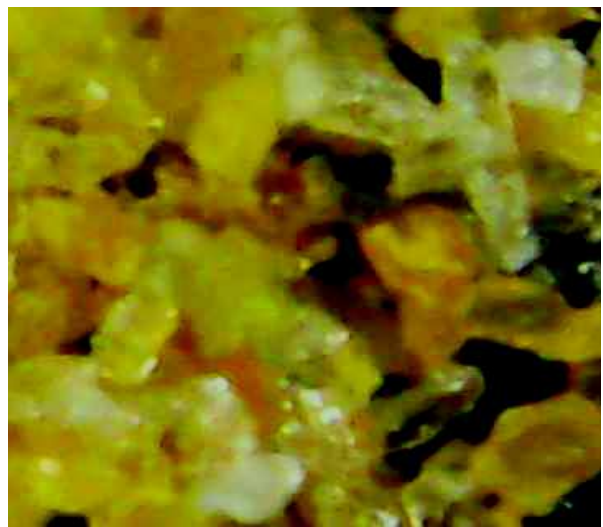


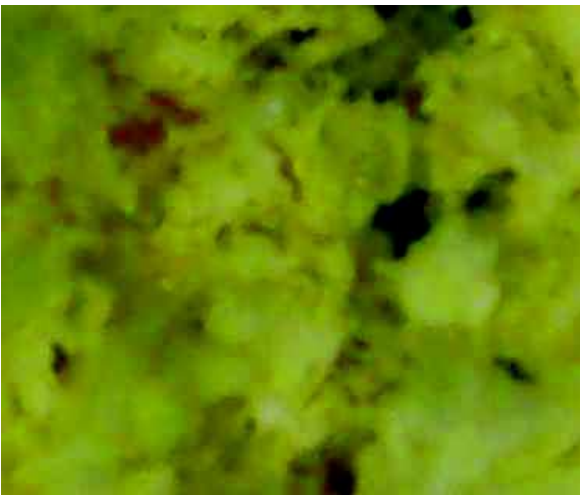
Figura 4



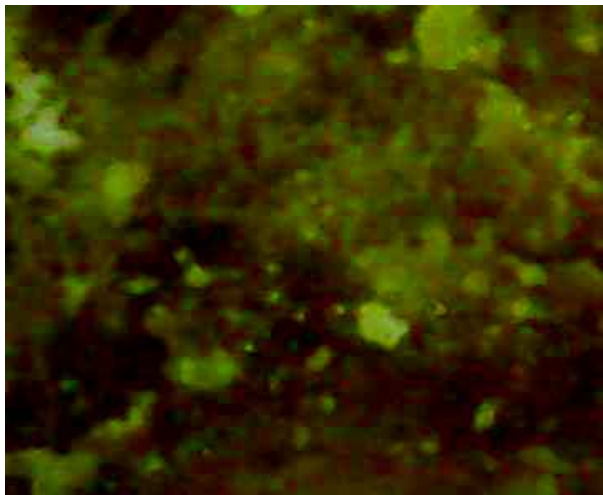
**Figura 5a**



**Figura 5b**



**Figura 5c**



**Figura 5d**

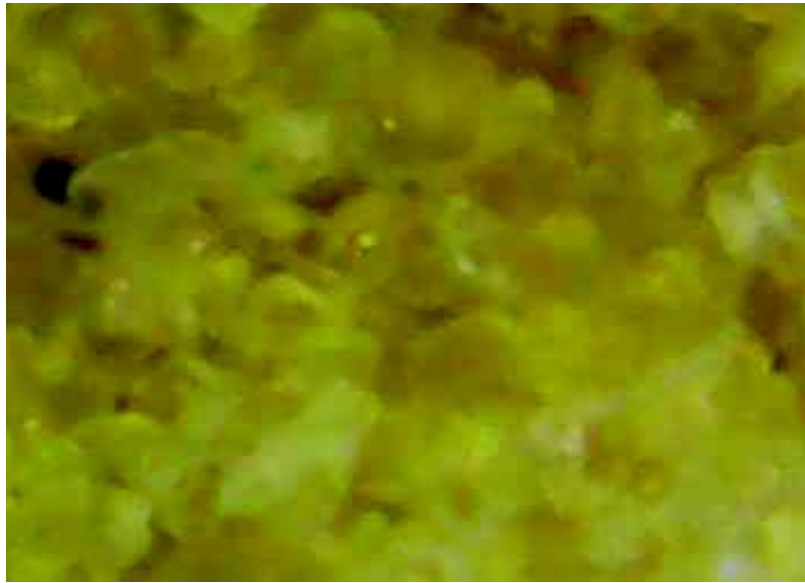


Figura 6

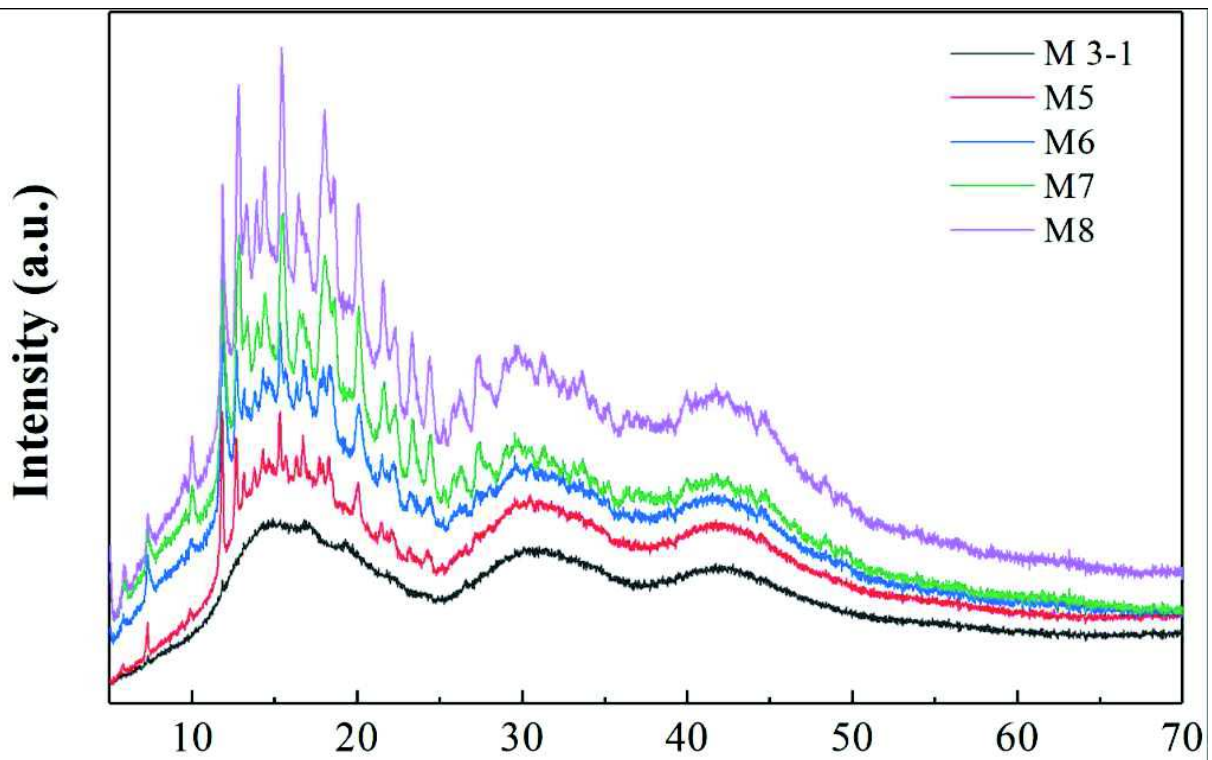


Figura 7