

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 345 806**

21 Número de solicitud: 200900916

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.03.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2010**

Fecha de la concesión: **12.07.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **22.07.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
22.07.2011

73 Titular/es:
**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Párraga Meneses, Jenny;
Konat Zorzi, Giovanni;
Paolicelli, Patrizia;
Seijo Rey, Begoña y
Sánchez Barreiro, Alejandro**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Sistemas nanoparticulares elaborados a base de polímeros aniónicos para administrar moléculas bioactivas para uso cosmético.**

57 Resumen:

Sistemas nanoparticulares elaborados a base de polímeros aniónicos para administrar moléculas bioactivas para uso cosmético.

La presente invención se refiere a un sistema para la administración de moléculas bioactivas para uso cosmético, que comprende nanopartículas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden a su vez: (a) al menos un polímero aniónico; (b) un agente reticulante catiónico; y opcionalmente (c) un polímero catiónico; y al menos una molécula bioactiva para uso cosmético, preferentemente kinetina, caracterizado porque las nanopartículas se encuentran entrecruzadas mediante interacciones de tipo electrostático. Adicionalmente, la invención se refiere a composiciones cosméticas y de higiene personal que comprenden dicho sistema de nanopartículas, así como a procedimientos para su preparación y usos del mismo.

ES 2 345 806 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Sistemas nanoparticulares elaborados a base de polímeros aniónicos para administrar moléculas bioactivas para uso cosmético.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo de sistemas nanoparticulares útiles en la administración de moléculas bioactivas para uso cosmético, en particular kinetina. Más específicamente, la invención se refiere a sistemas nanoparticulares que comprenden un polímero o una mezcla de polímeros dotados de carga eléctrica negativa y una molécula o mezcla de moléculas de bajo peso molecular de carga positiva capaces de actuar como reticulantes iónicos de los polímeros anteriores sin establecer enlaces químicos con los mismos. Adicionalmente, la invención se refiere a composiciones cosméticas que los comprenden, así como a procedimientos para su preparación.

15 **Antecedentes de la invención**

La nanotecnología en general y, más concretamente, los sistemas nanoparticulares, presentan un enorme potencial claramente reconocido en numerosos campos (UNESCO, *The ethics and politics of nanotechnology*, División of Ethics of Science and Technology, UNESCO Ed., París, 2006), habiendo despertado un gran interés sobre todo en el campo biomédico (U.S. Food and Drug Administration. *Nanotechnology, A Report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force*, FDA Ed., Rockville, MD, July 2007), (OMS, Initiative for Vaccine Research of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, *WHO/IVB/06.03*, WHO Ed., Geneva, Switzerland, *April 2006*). A pesar de lo anteriormente mencionado, los sistemas nanoparticulares desarrollados hasta la fecha no han dado respuesta a las expectativas inicialmente depositadas en ellos. En consecuencia, la idea general es que es necesario el desarrollo de nuevos sistemas capaces de alcanzar el reto que supone el adecuado aprovechamiento de su reconocido potencial (M. Friede and M.T. Aguado, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 2005, 325-31); (T.G. Park, J.H. Jeong, S.W. Kim, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 2006, 467-486).

Las causas de las limitaciones anteriormente expuestas son diversas. Considerando el caso concreto de las nanopartículas a base de quitosano, polímero citado ampliamente en la literatura como indispensable para la formación de las mismas por reticulación iónica, recientemente se ha hecho alusión a la ausencia de valor añadido de este tipo de sistemas en comparación con formulaciones más sencillas. Concretamente, los resultados que presentan algunos trabajos cuestionan la pretendida versatilidad y potencial de las nanopartículas de quitosano, al no encontrar diferencias significativas en su comparación con simples disoluciones de la molécula bioactiva y dicho polímero (A. M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, and L. Illum, *Pharm. Res.*, 19, 2002, 998-1008). Por otro lado, recientemente se ha señalado la citotoxicidad asociada a dichas nanopartículas de quitosano, que se ha relacionado directamente con la carga eléctrica superficial de estos sistemas (B. Loretz and A. Bernkop-Schnürch, *Nanotoxicology*, 1, 2007, 139-148). Este tipo de resultados de toxicidad preocupan especialmente a agencias regulatorias como la FDA, la cual cree importante no perder de vista aspectos como la importante carga positiva asociada a algunos sistemas nanoparticulares (U.S. Food and Drug Administration. *Nanotechnology, A Report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force*, FDA Ed., Rockville, MD, July 2007). Es obvio, no obstante, que las ventajas o limitaciones de un sistema nanoparticular no se derivan exclusivamente de una única característica como su carga superficial, sino más bien de un conjunto de características entre las que, además de la carga superficial, también hay que tener en cuenta la propia naturaleza de los componentes empleados en la elaboración de dichas nanopartículas. Como ejemplo ilustrativo podemos recordar que el carácter mucoadhesivo y la capacidad de interacción con las superficies mucosas de nanopartículas elaboradas a base de un polímero como el quitosano, han sido exclusivamente relacionados con la naturaleza catiónica de este polímero y la carga superficial positiva de los sistemas que se basan en su empleo. No obstante, la carga superficial no se puede considerar el único factor responsable de tal comportamiento o propiedades, habida cuenta de que no se observan en igual medida cuando se emplean otros polímeros también catiónicos. De hecho, en un estudio previo se ha podido demostrar cómo sistemas nanoparticulares recubiertos con polímeros catiónicos como la polilisina y el quitosano presentan comportamientos drásticamente diferentes tras su administración *in vivo*, pese a poseer carga neta superficial similar (Calvo P, Vila-Jato JL and Alonso MJ; *Int J Pharm.*, 153, 1997, 41-50). Por tanto, parece lógico pensar que la propia naturaleza de los componentes de este tipo de sistemas nanoparticulares, junto con sus características físico-químicas, son determinantes de su comportamiento y, en consecuencia, de su potencial, tal y como ha sido recientemente indicado (Moreau *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 10, 2002, 161-173).

Consideraciones como las anteriormente expuestas han llevado recientemente a sugerir el interés de investigar la aplicación de nanotecnologías a nuevos materiales y desarrollar, de este modo, nuevos sistemas nanoparticulares (U.S. Food and Drug Administration, FDA Consumer magazine, FDA Ed., November-December 2005 Issue, 2005). Este interés se hace más patente en el caso de nanosistemas destinados a administración sistémica, donde los problemas de toxicidad y/o efectos adversos o no deseados asociados a la carga superficial o las características propias de los materiales empleados hasta ahora en su desarrollo, cobran especial importancia. De hecho, aunque un sistema con carga neta positiva pueda resultar de gran interés como vehículo de administración tópica, esa carga positiva también puede suponer un problema cuando se administra por vía sistémica ya que, sin duda, dará lugar a hemoaglutinación y otros efectos adversos relacionados con su interacción con componentes naturales del organismo (Kainthan *et al.*, *Biomaterials* 27, 2006, 5377-5390). Posiblemente por ello, diversos expertos en el campo de la terapia génica han llegado incluso a predecir que el desarrollo de nuevos vehículos es un campo de trabajo que se prolongará durante los

ES 2 345 806 B1

próximos 35 años (N. Blow, *Nature*, 450, 2007, 1117-1120), haciendo especial mención de las limitaciones a las que se ha hecho alusión para el desarrollo de vehículos de administración sistémica.

5 Hasta el momento, se han empleado varios materiales para formular sistemas nanoparticulados, muchos de los cuales han sido capaces de actuar como vehículos de administración de fármacos o material genético. No obstante, aunque en muchos casos se habla de sistemas de nanopartículas, es necesario tener presente que bajo tal denominación se pueden englobar dos tipos de sistemas claramente diferentes en cuanto a técnica de elaboración, estructura, capacidad de asociación y liberación de moléculas, versatilidad y potencial. Estos sistemas, claramente diferenciados en la bibliografía (J.K. Vasir and V. Labhasetwar, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3, 2006, 325-344) (Q. Gana, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44, 2005, 65-73), son los siguientes:

15 - Complejos nanoparticulares establecidos entre materiales cargados positivamente y una molécula bioactiva con carga neta negativa, como un derivado de ácido nucleico. Por ejemplo, la elevada densidad de grupos amino presentes en el esqueleto del quitosano permite la complejación de plásmidos ADN, de carga negativa, dando lugar a la formación de forma espontánea pero no controlada de complejos auto-ensamblados entre ambos componentes. Estos complejos se obtienen sin poder controlar propiedades tan importantes como el tamaño o la carga superficial de los mismos, ya que la formación de este tipo de partículas se debe al mero tropismo que se establece entre dos moléculas de carga opuesta. De hecho, sin la concurrencia de la molécula bioactiva de carga neta negativa no sería posible obtener tales nanosistemas. Por consiguiente, no es posible desarrollar nanopartículas de este tipo blancas o sin cargar con dicha molécula.

20 - Nanopartículas elaboradas a base de polímeros reticulados. La reticulación es un proceso controlado que permite la obtención de nanopartículas de tamaño y carga superficial predeterminadas, homogéneas, ajustables y reproducibles. El proceso de reticulación puede ser de tipo químico o iónico. El primero de dichos procesos se basa en la formación de enlaces covalentes estabilizantes debido al empleo de agentes del grupo de los aldehídos, que se caracterizan por su toxicidad y por no ser aceptados para su empleo en humanos. Además, este tipo de agentes pueden dar lugar también a la reticulación e inactivación de la propia molécula bioactiva que se pretende asociar al sistema, sobre todo si se trata de moléculas con grupos amino, como en el caso de péptidos y proteínas. Todos estos problemas de los aldehídos y agentes reticulantes químicos se encuentran descritos en la literatura.

30 Por el contrario, la técnica de reticulación iónica, también denominada de gelificación iónica o ionotrópica, se caracteriza por su suavidad y por ser reversible. De modo tradicional esta técnica se ha desarrollado entre una macromolécula catiónica y un polianión, dando lugar a la formación de sistemas que, a diferencia de los complejos, se caracterizan por ser estructuras matriciales en las que la molécula bioactiva asociada se encuentra total o parcialmente atrapada en el seno de la matriz polimérica constitutiva de las mismas y generada en el proceso de entrecruzamiento ionotrópico. Esta matriz polimérica se obtiene como resultado de uniones iónicas inter- e intra-moleculares entre el polianión y la macromolécula catiónica, que gelifica espontáneamente bajo forma nanoparticulada. Este mecanismo de formación aporta, como valor añadido con respecto a los complejos, una protección de la molécula bioactiva frente al medio externo que no pueden aportar en igual medida aquellos. Consecuentemente, estamos ante una técnica rápida, económica, fácilmente reproducible y escalable y que requiere de una tecnología muy simple, aspectos todos ellos de indudable interés para la industria.

45 La técnica de reticulación iónica ha sido descrita para la formación de nanopartículas de quitosano, molécula catiónica que se reticula con el polianión tripolifosfato. No obstante, las limitaciones anteriormente señaladas para este tipo de sistemas que incluyen en su composición quitosano han llevado a diversos autores a desarrollar sistemas en los que se combinan con quitosano diferentes macromoléculas amónicas, como por ejemplo ácido hialurónico, pero que siempre han requerido de la presencia de quitosano para su formación.

50 Otros materiales que también han sido utilizados en el estado de la técnica para la obtención de sistemas de nanopartículas comprenden dextranos, carragenina y poliarginina.

55 Así, los documentos WO2005021044 y US20077155658 describen sistemas menores de 200 nm que necesitan en una primera fase el empleo de carbohidratos capaces de complejar el material genético a asociar y, posteriormente, la adición de poliarginina.

Los documentos US 6,565,873 y US 7,053,034 describen nanopartículas para cuya formación se requiere la utilización de materiales grasos.

60 Los documentos US 2005/0266090 A1 y US 2005/0008572 A1 describen la formación de sistemas núcleo-cubierta ("core-shell", "Core-coat" o bien "onion-like"), constituidos por dos partes diferenciadas: un núcleo polimérico y una corona polimérica de diferente composición rodeando a dicho núcleo. Dichas estructuras son el resultado de aplicar una técnica en la que los polímeros constitutivos son añadidos de forma secuencial y en la que es preciso emplear, entre otras, etapas de atomización de las soluciones (Prokop *et al.*, 2001; Prokop *et al.*, 2002).

65 Por otra parte, las técnicas utilizadas para la formación de nanopartículas y sistemas nanoparticulados son en general complejas y requieren composiciones determinadas que repercuten en las propiedades y características de los mismos. El documento WO 2001/9620698 A1 describe nanopartículas obtenidas por una metodología de emulsificación que hace necesario el empleo de disolventes orgánicos. El empleo de dichos disolventes entraña una serie de

ES 2 345 806 B1

riesgos perfectamente conocidos por las industrias por dar lugar a especial preocupación por parte de las agencias regulatorias.

5 Las nanopartículas descritas en el documento US 2005/0008572 A1 y que contienen un tipo de dextranos (dextranos polialdehído) necesitan, para su formación, el establecimiento de un enlace covalente con dicho componente para que se formen las mismas, llevando finalmente a la formación de una entidad química distinta.

10 El documento US 6,383,478 B1 se refiere a nanopartículas para cuya elaboración es necesaria la obligada incorporación de, por lo menos, dos polianiones, además de uno o más cationes pequeños. En definitiva, se trata de sistemas con un significativo grado de complejidad en cuanto a su composición.

El documento US 7,045,356 describe nanopartículas multicapa para cuya formación es necesario establecer unas condiciones tales que permitan la formación de enlaces intermoleculares entre los polímeros.

15 El documento US 6,916,490 trata de sistemas coacervados microparticulares que para su formación requieren reticulación química entre los polímeros.

20 Los documentos US 6,919,091 y 7,098,032 describen sistemas de nanopartículas menores de 100 nanómetros para cuya formación es preciso desarrollar tres etapas: (1º) complejación del material genético a asociar; (2º) complejación con un segundo polímero; (3º) reticulación iónica final para garantizar la integridad del sistema.

Los documentos US 6,475,995 y 7,344,887 describen nanoestructuras producidas por electrodeposición o por coacervación siendo los polímeros sugeridos gelatina o quitosano.

25 A la vista de los documentos del estado de la técnica y de los inconvenientes que presentan los actuales sistemas nanoparticulados en cuanto a composición, toxicidad y procedimiento de obtención, existe, por tanto, la necesidad de desarrollar sistemas nanoparticulados partiendo de materiales y reactivos biocompatibles de baja toxicidad que proporcione un alto control en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas y que puedan ser obtenidos mediante procedimientos sencillos y eficaces.

30

Breve descripción de la invención

35 Los autores de la presente invención han encontrado que un sistema nanoparticulado de fácil obtención mediante un procedimiento de gelificación iónica, en donde las nanopartículas comprenden un polímero aniónico entrecruzado en presencia de un agente reticulante catiónico, permite una eficaz asociación de moléculas bioactivas para uso cosmético, en particular kinetina y su consiguiente liberación en el medio adecuado, liberación que puede ser controlada mediante la selección de los componentes de las nanopartículas. Dichas nanopartículas presentan la característica adicional de no presentar toxicidad y ser estables en medios biológicos evitando además la degradación de las moléculas que llevan incorporadas.

40

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un sistema para la administración de moléculas bioactivas para uso cosmético que comprende nanopartículas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden:

45

- a) al menos un polímero aniónico;
- b) un agente reticulante catiónico; y opcionalmente
- c) un polímero catiónico;

50

y al menos una molécula bioactiva para uso cosmético, preferentemente kinetina,

caracterizado porque las nanopartículas se encuentran entrecruzadas mediante interacciones de tipo electrostático.

55

En otro aspecto, la invención hace referencia a una composición cosmética que comprende un sistema como se ha definido previamente.

En otro aspecto, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido anteriormente que comprende:

60

- a) preparar una solución acuosa de al menos un polímero aniónico;
- b) preparar una solución acuosa de un agente reticulante catiónico y, opcionalmente adicionar a ésta un polímero catiónico;
- 65 c) mezclar bajo agitación las soluciones obtenidas en a) y b) con formación espontánea de las nanopartículas.

La invención hace referencia asimismo al uso de un sistema como se ha definido anteriormente para mejorar la estabilidad en un producto cosmético.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Imágenes de TEM de sistemas nanoparticulares elaboradas a base de sulfato de condroitina asociando kinetina.

Figura 2. Imágenes de TEM de sistemas nanoparticulares elaboradas a base de ácido hialurónico asociando kinetina.

Figura 3. Estudio de liberación de kinetina a partir de nanopartículas: Modulación de los perfiles de liberación mediante modificación de la composición de las nanopartículas. Nanopartículas elaboradas empleando: ácido hialurónico (A), sulfato de condroitina (B) o mezclas sulfato de condroitina/gelatina previamente cationizada (C).

Figura 4. Estudio de liofilización: Tamaño medio de sistemas nanoparticulares elaborados a base de sulfato de condroitina asociando kinetina (carga de 2.5%) antes y después de su liofilización en presencia de diferentes porcentajes de trealosa como agente crioprotector.

Figura 5. Estudio de estabilidad: Evolución del tamaño medio durante el almacenamiento a diferentes temperaturas de sistemas nanoparticulares elaborados a base de sulfato de condroitina asociando kinetina (carga de 2.5%), liofilizados en presencia de diferentes porcentajes de trealosa como agente crioprotector.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a la elaboración de sistemas nanoparticulares para la administración de moléculas bioactivas para uso cosmético, que comprende nanopartículas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, donde dichas nanopartículas comprenden al menos un polímero aniónico; un agente reticulante catiónico; y opcionalmente un polímero catiónico; y caracterizado porque las nanopartículas se encuentran entrecruzadas mediante interacciones de tipo electrostático.

En la presente invención, por el término “nanopartículas” se hace referencia a estructuras estables y de características homogéneas, reproducibles y modulables perfectamente diferenciables de sistemas autoensamblados, que se forman como consecuencia de un proceso controlado de entrecruzamiento ionotrópico del polímero aniónico constitutivo de las mismas mediado por agentes reticulantes catiónicos. La interacción electrostática que resulta entre los diferentes componentes de las nanopartículas en el proceso de reticulación genera entidades físicas características, que son independientes y observables, cuyo tamaño promedio es inferior a 1 μm , es decir, un tamaño promedio de entre 1 y 999 nm.

Por el término “tamaño promedio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas, que comprende la estructura reticulada polimérica, que se mueve junta en un medio acuoso. El tamaño promedio de estos sistemas puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica.

Las nanopartículas del sistema de la invención tienen un tamaño de partícula promedio inferior a 1 μm , es decir, tienen un tamaño promedio de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 50 y 600 nm, incluso más preferiblemente de entre 100 y 400 nm. El tamaño promedio de las partículas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación de partículas.

Por otra parte, las nanopartículas pueden presentar una carga eléctrica (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de la proporción de los diferentes componentes en el sistema. En una realización particular de la invención, las nanopartículas presentan carga negativa que puede variar entre -1 mV y -30 mV.

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

Polímero aniónico

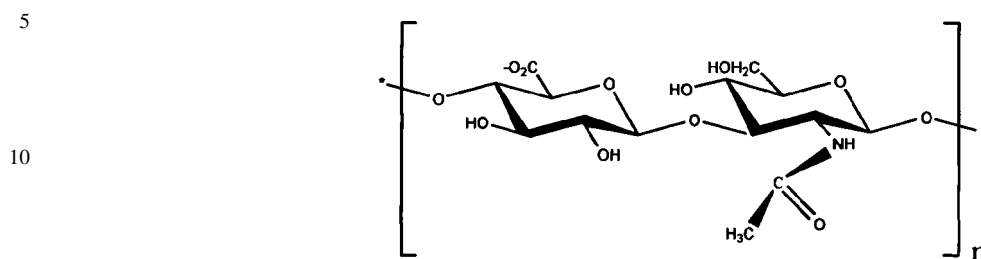
Por el término “polímero aniónico” se entiende cualquier polímero, preferiblemente de origen natural, con una carga neta negativa, incluyendo en dicha definición aquellos polímeros aniónicos sobre los que se han efectuado modificaciones tales como fragmentación enzimática o química o derivatización. En una realización particular, el polímero aniónico se selecciona entre ácido hialurónico o sales del mismo, sulfato de condroitina, así como fragmentos de los mismos o derivados de los mismos.

Ácido hialurónico

El ácido hialurónico o hialuronano es un glucosaminoglicano ampliamente distribuido a lo largo de los tejidos conjuntivo, epitelial y neural. Es uno de los principales componentes de la matriz extracelular y en general contribuye significativamente a la proliferación y migración celular.

ES 2 345 806 B1

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



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

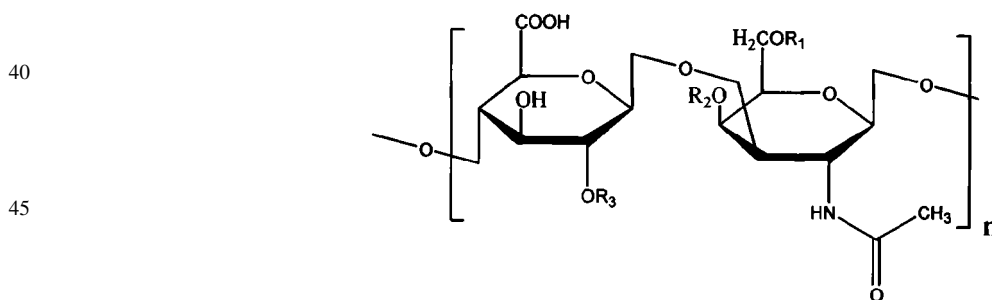
20 En el contexto de la presente invención, se puede emplear ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos moleculares. El ácido hialurónico de elevado peso molecular está comercialmente disponible, mientras que el de peso molecular inferior puede obtenerse mediante la fragmentación del ácido hialurónico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

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

30

Sulfato de condroitina

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



50 en la que n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacáridos en la cadena de sulfato de condroitina y en la que R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo SO_3H . Cada monosacárido puede dejarse sin sulfatar, sulfatarse una vez, o sulfatarse dos veces. La sulfatación está mediada por sulfotransferasas específicas.

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

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

- sulfato de condroitina A que está sulfatado predominantemente en el carbono 4 del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) y que también se conoce como sulfato de 4-condroitina ($R_1=\text{H}$, $R_2=\text{SO}_3\text{H}$ y $R_3=\text{H}$)
- 65 - sulfato de condroitina B que se denomina también sulfato de dermatano. Esta sustancia está compuesta por unidades de repetición lineales que contienen N-acetilgalactosamina y o bien ácido L-idurónico o bien ácido glucurónico, y cada disacárido puede estar sulfatado una vez o sulfatado dos veces.

ES 2 345 806 B1

- sulfato de condroitina C que está sulfatado predominantemente en el carbono 6 del azúcar GalNAc y que se conoce también como sulfato de 6-condroitina ($R_1=SO_3H$, $R_2=H$ y $R_3=H$);
- sulfato de condroitina D que está sulfatado predominantemente en el carbono 2 del ácido glucurónico y en el carbono 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina ($R_1=SO_3H$, $R_2=H$ y $R_3=SO_3H$);
- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 4,6-condroitina ($R_1=SO_3H$, $R_2=SO_3H$ y $R_3=H$);

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

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

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

El sulfato de queratano es un glucosaminoglucano sulfatado similar al sulfato de condroitina en el que el grupo sulfato se encuentra en el glucurónico.

Agente reticulante

Las nanopartículas de la invención se caracterizan por haberse formado a través de un mecanismo de interacción iónica que provoca la precipitación conjunta de los componentes de dichas nanopartículas en forma de nanoclusters como consecuencia de la adición de un agente reticulante de carga positiva. Además de ser un procedimiento sencillo, no se requiere el uso de disolventes orgánicos o de sustancias auxiliares tóxicas. La presencia del agente reticulante catiónico permite el entrecruzamiento del polímero aniónico, y en su caso el entrecruzamiento de éste con el polímero catiónico opcional, mediante un proceso de gelificación iónica provocando la formación espontánea de las nanopartículas. De esta manera se obtienen nanopartículas con un tamaño, potencial y unas características estructurales que las hacen ser adecuadas como sistemas de administración de moléculas bioactivas.

En una realización particular, el agente reticulante es una amina de fórmula $H_2N-[(CH_2)_x-NH-(CH_2)_y]_z-NH_2$, donde x , y y z toman, independientemente, un valor comprendido entre 1 y 66. Preferentemente, x , y y z , independientemente, presentan un valor comprendido entre 1 y 10.

De forma más preferente, la amina se selecciona entre aminas naturales como espermina, espermidina y sales de las mismas. Estas aminas son componentes naturales de las células y fluidos corporales y desempeñan un papel fundamental en los procesos de proliferación y diferenciación celular y de síntesis de macromoléculas biológicas. Aunque las células son capaces de sintetizar las aminas que necesitan para los procesos de crecimiento celular, han sido descritos mecanismos de internalización celular que les permiten obtener estas aminas del torrente sanguíneo. Estos mecanismos están influenciados por proteoglucanos como el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico (Belting M. *Et al.* Biochem J 1999, 338, 317-323). Por lo tanto, parece lógico suponer un efecto sinérgico entre los constituyentes de las nanopartículas objeto de la presente invención y el agente reticulante empleado en su elaboración.

En una realización particular, la relación en peso agente reticulante/polímero aniónico está comprendida entre 0.1/1 y 0.5/1, preferentemente entre 0.2/1 y 0.4/1, lo que proporciona formulaciones con una baja polidispersidad.

Polímero catiónico

En una realización particular de la invención, las nanopartículas que constituyen el sistema pueden opcionalmente comprender un polímero de carga positiva con el fin de modular las características de los sistemas nanoparticulares que más importancia presentan en su interacción con los medios biológicos, como son el tamaño de partícula, la carga eléctrica superficial y la composición y dotarlas así de una mayor versatilidad.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "polímero catiónico" cualquier polímero, preferentemente de origen natural, con una carga neta positiva. En una realización particular, el polímero catiónico es una proteína modificada como la gelatina cationizada.

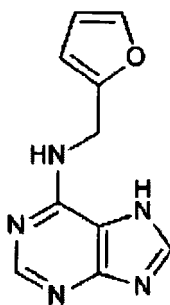
ES 2 345 806 B1

Por "gelatina cationizada", se entiende la molécula de gelatina modificada de manera que se introducen grupos amino que le otorgan un mayor carácter catiónico al que puede poseer sin modificar.

Las nanopartículas de la presente invención proporcionan sistemas con una elevada capacidad de asociación de moléculas bioactivas para uso cosmético. En consecuencia, en un aspecto adicional la invención se refiere a un sistema como el que se ha definido anteriormente que comprende además una molécula bioactiva. La liberación de las moléculas bioactivas puede ser controlada mediante la selección de los componentes de las nanopartículas, lo cual supone un claro beneficio sobre formulaciones galénicas convencionales, en las cuales no es posible ejercer control sobre la liberación de una molécula asociada.

El término "molécula bioactiva para uso cosmético" se refiere a cualquier sustancia que se utiliza como cosmético, así como aquel compuesto que se destina a regenerar tejidos o en ingeniería de tejidos. Las nanopartículas objeto de la presente invención son adecuadas para asociar moléculas bioactivas para uso cosmético independientemente de las características de solubilidad de las mismas. La capacidad de asociación dependerá de la molécula incorporada, pero en términos generales será elevada tanto para moléculas hidrófilas, como para las de marcado carácter hidrófobo. En una realización particular, la molécula bioactiva se selecciona entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos como oligonucleótidos, polinucleótidos o bien combinaciones de las moléculas citadas. En una realización más particular, la molécula bioactiva es kinetina.

La kinetina es un tipo de citoquinina, un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y diferenciación celular.



Su estructura deriva de una adenina con una cadena lateral unida al grupo amino en posición 6, responde a la N⁶-furfuriladenina.

La kinetina presenta propiedades antioxidantes y antienvjecimiento y por estos motivos se utiliza en tratamientos antienvjecimiento.

La proporción de molécula bioactiva incorporada en las nanopartículas puede llegar a ser de hasta el 95% en peso con respecto al peso total de los componentes de las nanopartículas. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la molécula bioactiva que va a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración. En una realización particular, la proporción de molécula bioactiva se encuentra entre 1 y 10% en peso.

Todas las moléculas bioactivas para uso cosmético que pueden ser incorporadas al sistema de nanopartículas de la invención mencionadas anteriormente, se pueden adicionar a las soluciones de los polímeros constituyentes de las nanopartículas previamente a la formación de las mismas o bien pueden ser adicionadas a las nanopartículas una vez formadas.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a una composición cosmética que comprende el sistema de nanopartículas previamente descrito. Este sistema nanoparticulado es especialmente ventajoso para constituir una composición cosmética debido a sus buenas propiedades para la administración sobre o a través de la piel, y a su estabilidad duradera.

Las composiciones cosméticas según la invención incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de nanopartículas) o cualquier composición que comprenda el sistema de la invención y que esté en la forma de gel, crema, pomada o bálsamo para su administración por vía tópica.

Dicha composición cosmética puede ser aplicada a diversas partes superficiales del cuerpo humano o animal tal como la piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos, y a dientes o mucosas del cuerpo humano o animal.

En una realización particular de la invención, la composición que comprenda el sistema de la invención tiene una finalidad de higiene persona o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado.

ES 2 345 806 B1

En un aspecto particular de la invención, la composición cosmética o de higiene personal también puede incorporar moléculas activas de naturaleza lipófila e hidrófila que, aunque no tengan ningún efecto terapéutico, tienen propiedades como agente cosmético o de higiene personal. Entre las moléculas activas que pueden incorporarse en las nanopartículas pueden citarse agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes antiseborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, enzimas, entre otros.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un sistema de nanopartículas como se ha definido previamente que comprende:

- a) preparar una disolución acuosa de al menos un polímero aniónico;
- b) preparar una disolución de un agente reticulante catiónico y, opcionalmente adicionar a dicha disolución un polímero catiónico;
- c) mezclar bajo agitación las disoluciones obtenidas en a) y b) con formación espontánea de las nanopartículas.

La incorporación del/los polímero/s aniónico/s se lleva a cabo mediante disolución acuosa del mismo a una concentración de entre 0,1 y 6 mg/mL, más preferiblemente entre 0,1 y 5 mg/mL.

De acuerdo con otra realización particular, el agente reticulante catiónico se disuelve en agua a una concentración de entre 0,0625 y 1,5 mg/mL, preferiblemente entre 0,25 y 1,5 mg/mL.

La formación de las nanopartículas objeto de la presente invención es consecuencia de un proceso controlado de entrecruzamiento ionotrópico de los componentes que presentan carga opuesta. Fruto de dicho proceso controlado, denominado reticulación iónica o ionotrópica, se obtienen nanopartículas de tamaño y carga superficial predeterminados, homogéneos, ajustables y reproducibles, con independencia de que se asocie o no molécula bioactiva alguna y de la carga eléctrica que ésta presente.

La molécula bioactiva para uso cosmético, y/o un compuesto estabilizante, es disuelta en una de las disoluciones a) o b), dependiendo de la carga que posea, es decir, si presenta carga negativa se disuelve en la disolución a) y, si por el contrario, presenta carga positiva, se disuelve en la disolución b). En un aspecto particular, cuando la molécula bioactiva es kinetina, se disuelve preferentemente en la disolución b), habida cuenta que a pH ácido la kinetina tiene carga positiva.

El procedimiento de elaboración de las nanopartículas mencionadas puede incluir una etapa adicional de liofilización, con el fin de preservarlas durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales y se reduzcan los volúmenes de producto que van a manipularse. Por otra parte, el grado de reticulación de las nanopartículas puede aumentar con este proceso, ya que puede tener lugar una aproximación entre las cadenas poliméricas, lo que podría facilitar que aumente el grado de entrecruzamiento polimérico, así como que se potencie el efecto del agente reticulante. Para la liofilización de las nanopartículas puede ser únicamente necesaria la adición de pequeñas cantidades de azúcares tales como glucosa, sacarosa o trealosa a una concentración que oscila desde un 1 hasta un 5% u otras moléculas que actúen como crioprotectores y/o lioprotectores. Las nanopartículas de la invención tienen la ventaja adicional de que el tamaño de partículas antes y después de la liofilización no se modifica de manera significativa. Es decir, las nanopartículas tienen la ventaja de que pueden liofilizarse y resuspenderse sin ninguna alteración en las características de las mismas.

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.

Ejemplos

Como procedimiento común a los ejemplos detallados a continuación, se ha caracterizado a las nanopartículas desde el punto de vista del tamaño, el potencial zeta (o carga superficial) y la eficacia de encapsulación.

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

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

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

ES 2 345 806 B1

La eficacia de asociación de kinetina a las nanopartículas ha sido determinada mediante una técnica espectrofotométrica. Para ello, se separó en las diferentes formulaciones la kinetina asociada a las nanopartículas de la kinetina libre, mediante membranas de ultrafiltración (AmiconUltra 5000 MW, Milipore, US) en una centrífuga (Microfuge 22R centrifuge, Beckman Coulter, US) (7500 xg, 30 minutos). La kinetina libre se cuantificó a una $\lambda=265$ nm frente a la correspondiente recta de calibrado y por diferencia se determinó la eficacia de asociación.

Para la realización del estudio de liberación de kinetina asociada a las nanopartículas se incubaron éstas a 37°C en diferentes medios (tampón HEPES pH 7.4, tampón acetato pH 5.5, HCl 0.01N pH 2). La kinetina liberada a diferentes tiempos se determinó de acuerdo con la metodología anteriormente descrita.

Los siguientes polímeros, tal y como se utilizan en los siguientes ejemplos, fueron adquiridos a diferentes casas comerciales: Ácido hialurónico, o hialurónico (Bioibérica, Spain), sulfato de condroitina (Calbiochem, USA).

La espermina fue adquirida a Sigma Aldrich (Spain).

La kinetina fue adquirida a Sigma Aldrich (Spain).

Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas elaboradas a base de sulfato de condroitina y asociación a las mismas de una molécula bioactiva

Se prepararon nanopartículas de sulfato de condroitina empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito. Se procedió a la asociación de una molécula hidrofílica de uso cosmético en su composición, seleccionando para tal fin una citoquinina, la kinetina. Se trata de una molécula cargada positivamente en las condiciones de formación de las nanopartículas, por lo que se incorporó junto al agente reticulante, de carga también positiva, para evitar la aparición de interacciones previas a la formación de las partículas.

Para ello se prepararon disoluciones acuosas de sulfato de condroitina en tampón acetato (15 mM, pH 5.5) a una concentración de 1.5 mg/mL. Como agente reticulante se empleó espermina disuelta en agua mili-Q a una concentración de 0.375 mg/mL. La kinetina se incorporó en una proporción de 2.5 y 5% en peso con respecto a los componentes anteriores, para lo cual se disolvió previamente en HCl 0.1N y se incorporó a la disolución del agente reticulante. La disolución resultante se mezcló con la disolución de sulfato de condroitina, bajo agitación magnética, la cual se mantuvo durante media hora, permitiendo la completa evolución del sistema hacia una forma nanoparticulada estable. La Tabla 1 muestra el diámetro medio, carga eléctrica superficial (potencial zeta) y la eficacia de asociación de la kinetina a los sistemas obtenidos.

TABLA 1

Características físico-químicas de las nanopartículas de sulfato de condroitina (ChS) empleando espermina (SPM) como agente reticulante y asociando kinetina (n=3)

Relación ChS:SPM	Agente reticulante	Kinetina (%)	Tamaño (nm)	Potencial ζ (mV)	Eficacia de Asociación (%)
8:1	Espermina	2.5	209 ± 6	-18.2 ± 0.1	> 95
8:1	Espermina	5.0	263 ± 10	-16.6 ± 0.1	> 95

Ejemplo 2

Caracterización morfológica de nanopartículas elaboradas a base de sulfato de condroitina asociando una molécula bioactiva

Se prepararon nanopartículas a partir de sulfato de condroitina empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito, conteniendo kinetina (carga de 2.5%). Los sistemas fueron caracterizados morfológicamente mediante microscopía de transmisión (TEM) (CM12, Philips, Eindhoven, The Netherlands), utilizando ácido fosfotúngstico 1% como agente de contraste. La Figura 1 muestra las correspondientes imágenes. En dichas imágenes puede comprobarse que los sistemas nanoparticulados presentan una forma regular esférica.

ES 2 345 806 B1

Ejemplo 3

Preparación de nanopartículas elaboradas a base de sulfato de condroitina asociando una molécula bioactiva y modulación de su carga superficial mediante incorporación de un polímero catiónico

5 Se prepararon nanopartículas de sulfato de condroitina utilizando espermina como agente reticulante iónico, según el procedimiento previamente descrito. Se procedió a la incorporación de un excipiente polimérico de carga opuesta al sulfato de condroitina, la gelatina previamente cationizada con espermina, con el fin de modular las características de las nanopartículas, concretamente la carga eléctrica superficial. Además se procedió a la incorporación de kinetina que se incorporó junto al agente reticulante, de carga también positiva, y la gelatina cationizada para evitar la aparición de interacciones previas a la formación de las partículas.

15 Para ello se preparó una disolución acuosa de sulfato de condroitina en tampón HEPES (15 mM, pH 7.4) a una concentración de 1.5 mg/mL y una disolución acuosa de gelatina previamente cationizada en agua mili-Q a una concentración de 2 mg/mL, y se mezclaron en una relación de masas de 5:3.5. Como agente reticulante se empleó espermina disuelta en agua mili-Q a una concentración de 0.375 mg/mL. La kinetina se incorporó en una proporción de 2.5% en peso con respecto a los componentes anteriores, para lo cual se disolvió previamente en HCl 0.1N y se incorporó a la disolución del agente reticulante y gelatina cationizada. La disolución resultante se mezcló con la disolución de sulfato de condroitina, bajo agitación magnética, la cual se mantuvo durante media hora, permitiendo la completa evolución del sistema hacia una forma nanoparticular estable.

25 De este modo, se prepararon nanopartículas con un tamaño medio de partícula de 248 ± 2 nm (índice de polidispersión de 0.047), carga eléctrica superficial negativa, de -5.8 ± 1.2 mV y una eficacia de asociación de la molécula bioactiva de $41 \pm 4\%$.

Ejemplo 4

Preparación de nanopartículas elaboradas a base de ácido hialurónico y asociación a las mismas de una molécula bioactiva

30 Se prepararon nanopartículas de ácido hialurónico empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito. Se procedió a la asociación de kinetina que se incorporó junto al agente reticulante, de carga también positiva, para evitar la aparición de interacciones previas a la formación de las partículas.

35 Para ello se prepararon disoluciones acuosas de ácido hialurónico en tampón acetato (15 mM, pH 5.5) a una concentración de 4.5 mg/mL. Como agente reticulante se empleó espermina disuelta en agua mili-Q a una concentración de 1.125 mg/mL. La kinetina se incorporó en una proporción de 5 y 10% en peso con respecto a los componentes anteriores, para lo cual se disolvió previamente en HCl 0.1N y se incorporó a la disolución del agente reticulante. La disolución resultante se mezcló con la disolución de ácido hialurónico, bajo agitación magnética, la cual se mantuvo durante media hora, permitiendo la completa evolución del sistema hacia una forma nanoparticular estable. La Tabla 2 muestra el diámetro medio, carga eléctrica superficial (potencial zeta) y la eficacia de asociación de los sistemas obtenidos.

TABLA 2

45 *Características físico-químicas de las nanopartículas de ácido hialurónico (HA) empleando espermina (SPM) como agente reticulante y asociando kinetina (n=3)*

Relación HA:SPM	Agente reticulante	Kinetina (%)	Tamaño (nm)	Potencial ζ (mV)	Eficacia de Asociación (%)
8:1	Espermina	5.0	472 ± 20	-17.5 ± 0.3	40 ± 6
8:1	Espermina	10.0	312 ± 15	-12.6 ± 0.4	16 ± 3

Ejemplo 5

60 *Caracterización morfológica de nanopartículas elaboradas a base de ácido hialurónico asociando una molécula bioactiva*

65 Se prepararon nanopartículas a partir de ácido hialurónico empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito, conteniendo kinetina (carga de 5%). Los sistemas fueron caracterizadas morfológicamente mediante microscopía de transmisión (TEM) (CM12, Philips, Eindhoven, The Netherlands), utilizando ácido fosfotúngstico 1% como agente de contraste. La Figura 2 muestra las correspondientes imágenes. En dichas imágenes puede comprobarse que los sistemas nanoparticulares presentan una forma regular esférica.

Ejemplo 6

Perfiles de liberación de una molécula bioactiva a partir de nanopartículas y modificación del mismo mediante la selección de los componentes de dichas nanopartículas

5 Se prepararon nanopartículas empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito, asociando kinetina (carga de 5%). Los sistemas fueron sometidos a un estudio de liberación *in vitro* en diferentes medios de liberación (tampón HEPES buffer pH 7.4, tampón acetato pH 5.5 o HCl 0.01N pH 2). La Figura 3 muestra los correspondientes perfiles de liberación. Como puede comprobarse, dichos perfiles pueden ser modulados mediante una adecuada selección de la composición de las nanopartículas: elaboradas empleando: ácido hialurónico (A), sulfato de condroitina (B) o mezclas sulfato de condroitina/gelatina previamente cationizada (C).

Ejemplo 7

15 *Liofilización de nanopartículas elaboradas a base de sulfato de condroitina asociando una molécula bioactiva*

20 Se prepararon nanopartículas a partir de sulfato de condroitina empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito, asociando kinetina (carga de 2.5%). La suspensión de las nanopartículas fue liofilizada a una concentración de 1 mg/mL en presencia de trealosa como agente crioprotector a diferentes concentraciones (10, 5 y 2.5% p/v). Para ello las formulaciones fueron sometidas a un proceso de congelación a -80°C y subsiguiente liofilización (Virtis Genesis freeze dryer, 25ES, Virtis, NY, USA). Tras la liofilización, los sistemas nanoparticulares fueron resuspendidos sin dificultad mediante adición de 1 mL de agua mQ, dando lugar a una suspensión de las nanopartículas a una concentración de 1 mg/mL y, a continuación, se determinó el tamaño medio de las nanopartículas. La Figura 4 muestra el tamaño medio de los sistemas nanoparticulares antes y después de su liofilización. Como puede comprobarse, el tamaño medio de los sistemas nanoparticulares se mantiene durante el proceso de liofilización.

Ejemplo 8

30 *Estabilidad de sistemas nanoparticulares liofilizados elaborados a base de sulfato de condroitina asociando una molécula bioactiva durante el almacenamiento a diferentes temperaturas*

35 Se prepararon nanopartículas a partir de sulfato de condroitina empleando espermina como agente reticulante según el procedimiento previamente descrito, asociando kinetina (carga de 2.5%). La suspensión de las nanopartículas fue liofilizada según el procedimiento previamente descrito a una concentración de 1 mg/mL y en presencia de 5% p/v de trealosa. Posteriormente los liofilizados se almacenaron a diferentes temperaturas. A diferentes tiempos de almacenamiento los sistemas nanoparticulares fueron resuspendidos sin dificultad mediante adición de 1 mL de agua mQ, dando lugar a una suspensión de las nanopartículas a una concentración de 1 mg/mL y, a continuación, se determinó el tamaño medio de las nanopartículas. La Figura 5 muestra la evolución del tamaño medio el tamaño medio de los sistemas nanoparticulares. Como puede comprobarse, éste se mantiene durante el almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura.

Ejemplo 9

45 *Cationización de gelatina*

50 La gelatina cationizada con espermina ha sido sintetizada según el método descrito por Seki *et al.* (Journal of Pharmaceutical Sciences 2006, 95(6), 1393-1401). Para ello se preparó una disolución de gelatina al 1% p/v (100 mg de gelatina en 10 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 5.3), a la que se añadieron 1620 mg (4.65 mmoles) de espermina y 267.5 mg (1.39 mmoles) de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida hidroclorehidrato (EDC). Seguidamente se ajustó el pH (pH=4.5) a un valor de pH=5 con NaOH, y el conjunto se dejó reaccionar durante 18 h en baño termostático, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente el conjunto se dializó y se liofilizó, obteniendo así la gelatina cationizada con etilendiamina que se reservó para su posterior utilización.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema para la administración de moléculas bioactivas para uso cosmético que comprende nanopartículas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden:
- (a) al menos un polímero aniónico;
 - (b) un agente reticulante catiónico; y opcionalmente
 - 10 (c) un polímero catiónico;
- y al menos una molécula bioactiva para uso cosmético, preferentemente kinetina,
- 15 **caracterizado** porque las nanopartículas se encuentran entrecruzadas mediante interacciones de tipo electrostático.
2. Sistema según reivindicación 1, donde el polímero aniónico se selecciona entre ácido hialurónico o sales del mismo y sulfato de condroitina.
- 20 3. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente reticulante catiónico es una amina seleccionada entre espermina y espermidina, o sales de las mismas.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polímero catiónico se selecciona entre proteínas modificadas, preferentemente gelatina cationizada.
- 25 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las nanopartículas se encuentran en forma liofilizada.
- 30 6. Una composición cosmética o de higiene personal que comprende un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Composición según reivindicación 6, para la administración sobre piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes o mucosas.
- 35 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que comprende además agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes antiseborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, o enzimas.
- 40 9. Un procedimiento para la preparación de un sistema como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende:
- a) preparar una disolución acuosa de al menos un polímero aniónico;
 - 45 b) preparar una disolución acuosa de un agente reticulante catiónico y, opcionalmente adicionar a ésta un polímero catiónico;
 - c) mezclar bajo agitación las disoluciones obtenidas en a) y b) con formación espontánea de las nanopartículas.
- 50
10. Procedimiento según reivindicación 9, que comprende además la adición de una molécula bioactiva para uso cosmético, y/o un compuesto estabilizante, en la disolución a) si es de naturaleza aniónica o en la disolución b) si es de naturaleza catiónica.
- 55
11. Procedimiento según reivindicación 10, donde la molécula bioactiva es kinetina que se incorpora en la disolución b).
- 60 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende una etapa adicional después de la etapa c) en el que las nanopartículas se someten a un proceso de liofilización.
13. Procedimiento según reivindicación 12, que comprende una etapa adicional en la que se regeneran las nanopartículas liofilizadas.
- 65 14. Composición cosmética o de higiene personal según se define en las reivindicaciones 6 a 8, para su uso en higiene o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado.

FIGURA 1

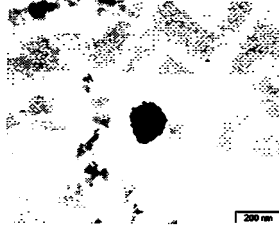


FIGURA 2

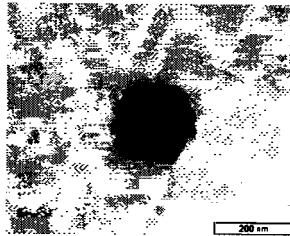
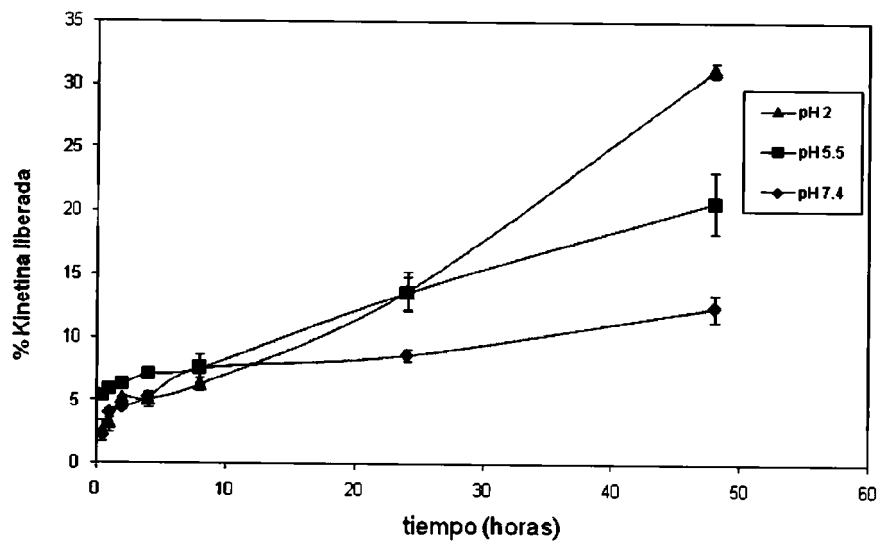
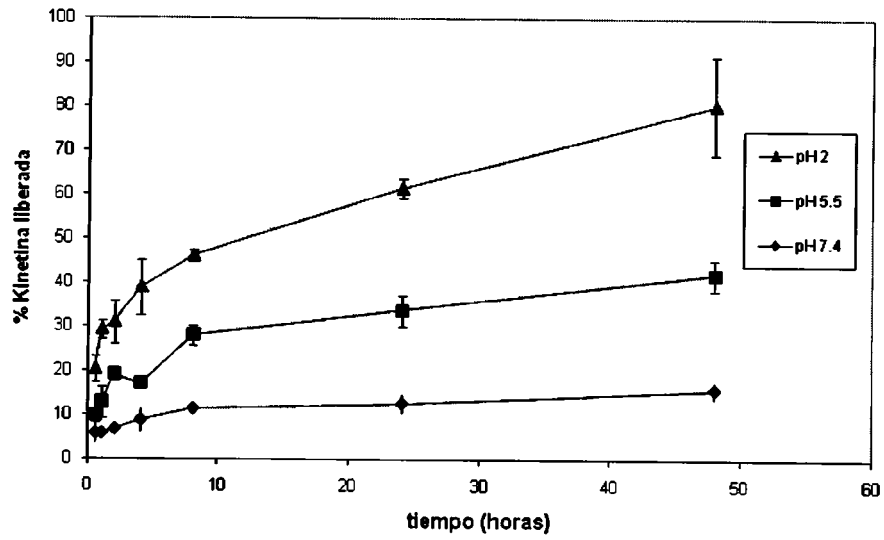


FIGURA 3

A



B



C

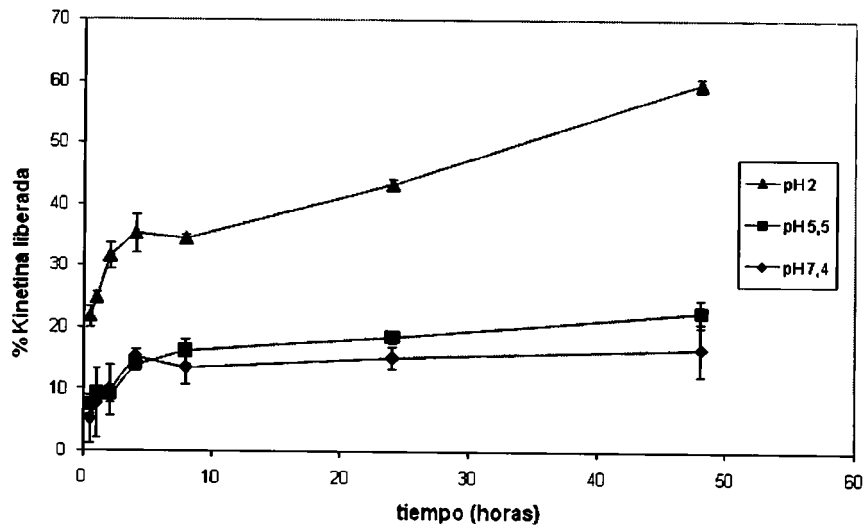


FIGURA 4

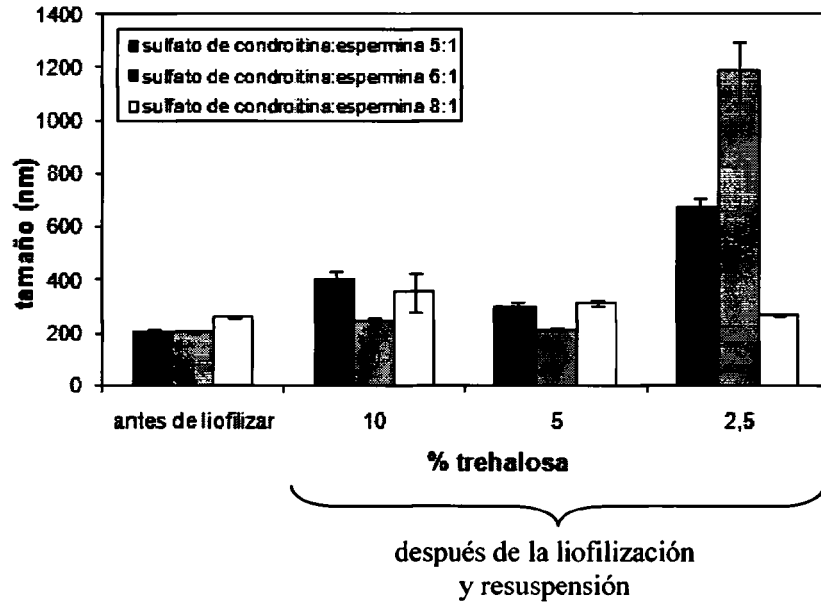
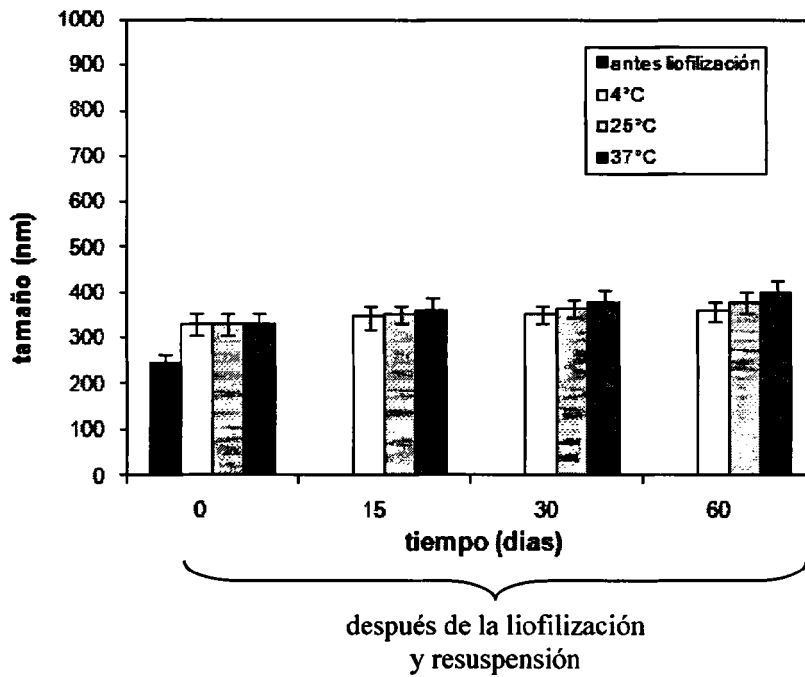


FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 806

② Nº de solicitud: 200900916

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.03.2009**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	US 2005008572 A1 (PROKOP et al.) 13.01.2005, párrafos [0019]-[0044],[0063]-[0083]; ejemplo 8.	1-5,9,10, 12,13 6-8,11,14
X Y	WO 9918934 A1 (VANDERBILT UNIVERSITY) 22.04.1999, página 4, línea 21 - página 6, línea 27; ejemplos 2-6; tabla I.	1-5,9,10, 12,13 6-8,11,14
X Y	US 2008254078 A1 (KAUPER et al.) 16.10.2008, párrafos [0019]-[0032],[0041]-[0045],[0053]-[0058]; ejemplos 1-3.	1-7,9,10, 12-14 8,11
X Y	TIYABOONCHAI, WARE et al.; Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles; International Journal of Pharmaceutics 329 (2007) páginas 142-149; ISSN 0378-5173.	1-5,9,10, 12,13 6-8,11,14
Y	WO 2007135164 A1 (ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOLOGIES, S.L., VILA PENA, ANA ISABEL) 29.11.2007, página 1, líneas 5-9; página 12, línea 29 - página 13, línea 10.	6-8,14
Y	KR 2007087874 A(KIM JAE YONG; HAN CHUNG SUB) 29.08.2007 (resumen) [en línea] [recuperado el 10.03.2010]. Recuperado de Epodoc.	11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 11.06.2010	Examinador N. Vera Gutiérrez	Página 1/5
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

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

A61K

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4, 8, 11	SÍ
	Reivindicaciones	1-3, 5-7, 9-10, 12-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-14	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2005008572 A	13-01-2005
D02	WO 9918934 A1	22-04-1999
D03	US 2008254078 A1	16-10-2008
D04	International Journal of Pharmaceutics 329 (2007) 142-149	2007
D05	WO 2007135164 A1	29-11-2007
D06	KR 2007087874 A	29-08-2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un sistema para la administración de moléculas bioactivas que incluye nanopartículas que comprenden a) al menos un polímero aniónico; b) un agente reticulante catiónico; opcionalmente c) un polímero catiónico, y al menos una molécula bioactiva para uso cosmético. Se refiere también a la composición que lo comprende, al procedimiento para su preparación y al uso de dicho sistema en el ámbito cosmético.

El documento D01 divulga una composición de nanopartículas que comprenden un núcleo con al menos un polímero polianiónico y un principio activo, y una corona rodeando el núcleo que comprende al menos un polímero catiónico y un ligando diano (párrafo [0072]). Pueden incluir también un agente bioluminiscente o un agente de contraste (párrafo [0073]). Entre los polímeros aniónicos figuran sulfato de heparina, carragenina, sulfato de condroitina, y entre los compuestos catiónicos, hidrocloreuro de espermina (párrafo [0034]). En el ejemplo 8 se prepara una composición de nanopartículas mediante la mezcla de dos corrientes poliméricas, una aniónica, con sulfato de condroitina y sulfato de heparina, y otra catiónica con hidrocloreuro de espermina.

El documento D02 divulga un sistema de liberación de fármacos a base de nanopartículas poliméricas, que se preparan mezclando en un reactor polímeros polianiónicos con cationes. Las nanopartículas presentan un núcleo polimérico que incluye un principio activo rodeado por una corona polimérica (página 14, líneas 14-17). En el ejemplo 2 se preparan nanopartículas combinando distintos polímeros aniónicos/catiónicos. En la Tabla I se recogen las combinaciones de polímeros preferidas y entre ellas figuran carragenina, sulfato de condroitina y heparina como polímeros aniónicos y, como componentes catiónicos, hidrocloreuro de espermina, gelatina y polilisina, entre otros. En el ejemplo 3 se preparan nanopartículas a partir de alginato sódico y sulfato de condroitina como polímeros aniónicos, e hidrocloreuro de espermina, hidrocloreuro de polilisina y cloruro de sodio como agentes policatiónicos. Las nanopartículas son liofilizadas posteriormente y pueden emplearse como vacunas administradas por vía oral, nasal, parenteral, etc (página 5, líneas 13-27).

El documento D03 se refiere a nanopartículas que contienen quitosano y un polisacárido aniónico como vehículo de administración de composiciones farmacéuticas, cosméticas o alimentarias (párrafos [0019], [0026]). Entre los polisacáridos aniónicos figuran sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, heparina y ácido hialurónico. En los ejemplos 1-3 se preparan nanopartículas mediante la incorporación de una solución acuosa del polisacárido aniónico (sulfato de condroitina, sulfato de dextrano o heparina) sobre una solución acuosa de quitosano.

En el documento D04 se describe la formulación de nanopartículas de anfotericina B. Se emplean dos polímeros de cargas opuestas para formar nanopartículas por interacción electrostática: quitosano (CH) como polímero de carga positiva y sulfato de dextrano (DS) como polímero de carga negativa, junto con sulfato de cinc como agente reticulante y de endurecimiento. Estas nanopartículas se liofilizan posteriormente.

A la vista de los documentos citados, se considera que las reivindicaciones 1-3, 5-7, 9-10, 12-14 no son nuevas (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

En el estado de la técnica se conocen documentos que divulgan el empleo de nanopartículas como vehículos de administración de moléculas para uso cosmético. Así, en el documento D05 se describe un sistema de nanopartículas de ácido hialurónico y quitosano de bajo peso molecular que puede formar parte de una composición cosmética. Esta composición incorpora, además, agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, etc (ver reivindicaciones 1,16 y 17).

Hoja adicional

Igualmente, son conocidas en el estado de la técnica las propiedades antiarrugas y antienvjecimiento de la kinetina. Así, el documento D06 divulga una composición que comprende kinetina estabilizada en forma de liposomas y su uso en cosmética (ver resumen).

Respecto a la reivindicación 4, relativa al polímero catiónico adicional presente en las nanopartículas, no es posible reconocer actividad inventiva puesto que, como se recoge en el documento D02, el empleo de varios compuestos de naturaleza catiónica para la preparación de las nanopartículas ya ha sido divulgado y se trataría de una selección arbitraria de los mismos.

Así, las reivindicaciones 7-9, 12, 15 de la solicitud carecen de actividad inventiva (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes).