



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 809**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 9/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05803808 .4**  
96 Fecha de presentación : **02.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1807046**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Micelas inversas basadas en fitoesteroles y acilgliceroles y uso terapéutico de las mismas.**

30 Prioridad: **02.11.2004 EP 04025991**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.06.2011**

73 Titular/es: **MEDESIS PHARMA SA**  
**L'Orée des Mas avenue du Golf**  
**34670 Baillargues, FR**

72 Inventor/es: **Maurel, Jean-Claude**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 809 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Micelas Inversas Basadas en Fitoesteroles y Acilgliceroles y Uso Terapéutico de las Mismas.

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de forma general a un sistema micelar inverso que comprende un agente terapéuticamente activo hidrosoluble. Las micelas inversas de acuerdo con la invención son particularmente útiles para administrar fármacos. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichas micelas inversas y los métodos para su preparación.

### Antecedentes de la invención

10 Durante los últimos años, se han propuesto varios métodos para mejorar la administración de los fármacos al sitio de destino. Primero, el fármaco se debe administrar mediante una vía adecuada y fácil, tal como las vías oral y rectal, y segundo, el ingrediente activo se debe administrar a las células destinatarias en la forma activa. Algunos fármacos, en particular las proteínas y los péptidos, se absorben mal y son inestables durante su paso por el tubo digestivo. Hasta la fecha se han realizado muchos intentos que mejoren la administración, en particular por la vía oral, de polipéptidos y péptidos, tales como, por ejemplo, insulina (para tratar la diabetes), interferones (para tratar la hepatitis), citocinas (para tratar las neoplasias malignas), etc. Sin embargo, hoy en día estos fármacos se administran mediante una inyección parenteral. A día de hoy, el 40% de los fármacos nuevos solo se pueden administrar mediante inyección parenteral.

15 A pesar de los problemas inherentes que se encuentran cuando se intentan administrar proteínas y péptidos por vía oral, se han propuesto varios métodos para mejorar la absorción oral. Las estrategias plausibles han incluido la modificación química para estabilizar el fármaco y/o convertirlo en más liposoluble y, por lo tanto, mejorar la probabilidad de que difunda a través de la membrana lipídica o el tubo digestivo. Otros investigadores han añadido estabilizantes tales como inhibidores de las peptidasas (p. ej., aprotinina) para reducir la pérdida metabólica, mientras otros han utilizado diferentes agentes facilitadores de la absorción en la forma de tensioactivos no iónicos, sales biliares y análogos de las mismas, fosfolípidos, quelantes o acilcarnitina. Numerosas patentes y publicaciones describen también métodos para encapsular los ingredientes activos en nanopartículas o micropartículas. Pero, hasta ahora, ninguno de los sistemas de administración desarrollados resulta totalmente satisfactorio, en particular para la insulina. Por ejemplo, los sistemas de administración descritos hasta ahora han permitido tan solo una absorción de la insulina del 2 al 5%.

20 Las personas que padecen diabetes de tipo 1 o 2 a menudo se tratan con insulina. Mientras que los dispositivos de inyección están mejorando y son menos invasivos (p. ej., dispositivos de tipo bolígrafo), las inyecciones todavía presentan desventajas y siguen siendo muy impopulares. Las formulaciones no inyectables presentarán grandes ventajas. Además de ser más agradables para el paciente, tales formulaciones podrían mejorar el cumplimiento y llevar a un mejor tratamiento y a una reducción de las complicaciones relacionadas con la diabetes.

25 Los inventores han descubierto previamente que agitar dos tipos de lípidos con algunas sales metálicas permitía aumentar la biodisponibilidad de los metales y en consecuencia obtener la misma actividad terapéutica con dosis de 1000 a 5000 veces más bajas; entonces se pudo reducir el potencial de toxicidad de dichas sales metálicas (véanse la patente de los Estados Unidos n.º 6 129 924, la patente internacional WO 02/36134 y la patente internacional WO 2004/075990 como ejemplos).

30 La patente europea EP-A-0 366 277 describe formulaciones administrables por vía oral o rectal de material activo en forma de una microemulsión de agua en aceite. La patente internacional WO 03/030865 muestra composiciones promicelares de un activo encapsulado en una membrana de ácidos grasos C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> esterificados. La patente internacional WO 91/14454 describe un material activo asociado a un fosfolípido.

Es un objetivo de la presente invención solventar las desventajas de la técnica anterior. Más particularmente, es un objetivo de la invención proporcionar un sistema de administración de fármacos que comprende un ingrediente activo, que se puede administrar por vía oral y que da una biodisponibilidad farmacológica satisfactoria.

### Compendio de la invención

35 La presente invención se refiere a un sistema de administración por transporte transmembranario para la liberación de un agente terapéutico de interés, así como a las composiciones y los métodos para preparar el sistema de administración. Más particularmente, la presente invención proporciona un sistema de transporte micelar inverso para dispensar un agente de interés. Más específicamente, las micelas inversas de acuerdo con la invención favorecen la absorción de moléculas biológicamente activas a través de las barreras epiteliales mucosas y permiten que las células destinatarias internalicen los ingredientes activos. Las micelas inversas de la invención comprenden más específicamente al menos un ingrediente terapéuticamente activo hidrosoluble, fitoesterol, acilglicerol y agua.

La presente invención se refiere más particularmente a micelas inversas con un núcleo acuoso menor o igual a 100 nm.

Las micelas inversas se pueden preparar de acuerdo con un método particular utilizando fitoesteroles y acilgliceroles.

Dichas micelas se obtienen mediante el método siguiente:

- a) poner en contacto i) fitoesterol, ii) acilglicerol, preferentemente diacilglicerol de ácidos grasos, iii) agua, en particular agua purificada y iv) al menos un ingrediente terapéuticamente activo hidrosoluble;
- b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a) a 40 °C o menos, y durante un tiempo suficiente, para obtener la formación de las micelas inversas, llevándose a cabo dicha agitación mecánicamente a una velocidad de unas 1000 a unas 5000 rpm o mediante sonicación.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende micelas inversas de la invención y un vehículo, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

### Descripción detallada de la invención

- La siguiente descripción es de las realizaciones preferentes por medio de ejemplos sólo y sin limitar la combinación de características necesarias para llevar a efecto la invención.

#### Micelas inversas

- El sistema micelar inverso de acuerdo con la invención se caracteriza como una microemulsión que comprende una dispersión de microgotas de agua en aceite. La dispersión se estabiliza mediante un tensioactivo (acilglicerol, más preferentemente diacilglicerol de ácidos grasos) en una interfaz de agua/aceite. La fase micelar inversa se puede definir como un sistema en el cual el agua forma la fase interna y las colas hidrófobas de los lípidos forman la fase continua. Las micelas inversas que contienen aceite(s), tensioactivo(s) y una fase acuosa también se caracterizan como microemulsiones de agua en aceite.

- El tamaño de las micelas varía de un modo lineal con la proporción en peso (agua)/(tensioactivo) W (agua solubilizada en la mezcla/el tensioactivo en la mezcla). Tal y como se mencionó anteriormente, la cantidad relativa en peso de agua en la mezcla (W) es preferentemente menor o igual a 2,5 y preferentemente menor o igual a 1 de la cantidad de acilglicerol, preferentemente de diacilglicerol de ácidos grasos. W es más específicamente de 0,01 a 0,2. De acuerdo con una realización particular, la proporción W es preferentemente de 0,05 a 0,18.

Las micelas inversas, tales como el tamaño del núcleo de las mismas, se pueden caracterizar por varios métodos:

- Dispersión de rayos X
- Dispersión de neutrones
- Microscopia de electrones de transmisión (MET)
- Dispersión de luz dinámica (DLD)

- Las proporciones de los constituyentes lipídicos (fitoesteroles y acilglicerol) en el sistema micelar inverso de acuerdo con la invención pueden variar considerablemente, por ejemplo, la proporción en masa fitoesterol/acilglicerol puede oscilar de 0,01 a 1 (incluidos). De acuerdo con una realización particular, se puede utilizar más acilglicerol (preferentemente diacilglicerol de ácidos grasos) que fitoesterol (preferentemente sitosterol). Más particularmente, la proporción en masa fitoesterol/acilglicerol es mayor o igual a 0,1, más preferentemente de 0,1 a 0,2.

- Los compuestos del sistema micelar inverso se pueden analizar mediante los medios adecuados. Más específicamente, se puede identificar el fitoesterol mediante análisis de cromatografía de gases y el acilglicerol mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en particular con un detector de dispersión de luz, en una columna de sílice (kromasil C18), en presencia de un eluyente, p. ej., acetonitrilo isocrático. También se puede utilizar la cromatografía de gases para analizar los diacilgliceroles.

- Las micelas inversas son sistemas dinámicos. El movimiento browniano provoca colisiones perpetuas de las micelas, lo que conduce a la coalescencia de las micelas y al intercambio de los núcleos acuosos. Al producirse la separación y regeneración de las micelas, se permiten las reacciones químicas entre diferentes soluciones. La tasa de intercambio entre las micelas aumenta en particular con la temperatura, la longitud de las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo, y la proporción W (el agua libre aumenta dicho intercambio). En el contexto de la invención, y al contrario de lo que se espera en la nanotecnología, el núcleo acuoso de las micelas debe tener un tamaño específico que permite que una o más moléculas del ingrediente terapéuticamente activo, introducidas cuando se prepararon las micelas, se estabilicen en éstas. El tamaño del núcleo acuoso es preferentemente menor o igual a unos 100 nm, y preferentemente menor o igual a 5 nm. La proporción W, tal y como se definió anteriormente, es preferentemente menor o igual a aproximadamente 2,5.

- El análisis del producto mediante dispersión de rayos X tal y como se describe en el ejemplo 1 puso de manifiesto las micelas inversas en una microemulsión.

La principal ventaja de la presente invención sobre la técnica previa es la utilización del fitoesterol, más preferentemente sitosterol, para la preparación de las micelas inversas. En consecuencia, la invención proporciona una absorción de los compuestos a administrar a través de la mucosa, preferentemente a través de la mucosa de la boca y del recto, más preferentemente a través de la mucosa de la boca. Igualmente, las micelas inversas de la presente invención proporcionan una biodisponibilidad importante con una absorción que varía poco. Otro aspecto beneficioso de las micelas inversas de la presente invención es que se pueden preparar con tamaños diferentes para adaptarlas a los ingredientes activos que hay que incluir en ellas.

#### Método para preparar micelas inversas

La invención se refiere a un método para preparar micelas inversas que presentan un núcleo acuoso menor o igual a 100 nm y comprende al menos un ingrediente activo terapéutico hidrosoluble, fitoesterol, acilglicerol y agua, en el que dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto i) fitoesterol, ii) acilglicerol, preferentemente diacilglicerol de ácidos grasos, iii) agua, en particular agua purificada, y iv) al menos un ingrediente activo terapéutico hidrosoluble, en el que la proporción  $W = [\text{agua}]/[\text{acilglicerol}]$  es preferentemente menor o igual a aproximadamente 2,5;
- b) agitar la mezcla obtenida en la etapa a), a 40 °C o menos, y durante un tiempo suficiente para formar las micelas inversas, llevándose a cabo dicha agitación mecánicamente a una velocidad de unas 1000 a unas 5000 rpm o mediante sonicación.

A continuación, las micelas inversas obtenidas y recuperadas resultan particularmente útiles como sistema de administración de fármacos. La etapa (b) del procedimiento tiene una importancia particular porque permite obtener micelas inversas, que luego son útiles como un sistema de transporte para administrar el fármaco en el sitio de destino.

Los compuestos utilizados en la etapa (a) se describirán con más detalle más adelante.

La agitación de la mezcla obtenida mediante la etapa (a) se lleva a cabo más particularmente a una temperatura menor o igual a 40 °C, preferentemente que oscila de 30 °C a 38 °C, más preferentemente de 30 °C a 35 °C, durante un tiempo suficiente para que se formen las micelas inversas. El tiempo suficiente puede variar en particular con las técnicas de agitación utilizadas, esto es, agitación mecánica o sonicación. El tiempo de la agitación mecánica o de la sonicación es en cualquier caso el tiempo necesario para convertir la mezcla inicial en una solución micelar inversa monofásica.

En una realización particular, el ingrediente terapéuticamente activo se solubiliza primero en agua (preferentemente agua purificada), que luego se pone en contacto con los otros constituyentes (etapa a).

El experto en la técnica sabe cómo seleccionar los excipientes o los componentes a utilizar junto con la composición de acuerdo con la presente invención para conseguir propiedades beneficiosas. En particular, la presencia de glicerol puede, cuando se introduce en gran cantidad, impedir la formación de micelas inversas o romper el sistema micelar inverso. Más específicamente, para la preparación de las micelas inversas de la presente invención se utiliza no más del 1%, y preferentemente nada, de glicerol (porcentaje expresado en peso de glicerol/cantidad total de agua de la composición).

#### SONICACIÓN

Los ultrasonidos de la sonicación conducen a una cavitación acústica dentro de los líquidos, a saber, formación de burbujas en el líquido. El ultrasonido produce una agitación homogénea en todas las partes de la cámara de reacción y proporciona poca turbulencia dentro del líquido. Se trata del método más fiable y útil para preparar nanopartículas. La estabilidad de las microemulsiones obtenidas se debe en particular al acilglicerol (preferentemente diacilglicerol de ácidos grasos) que actúa como tensioactivo.

Se pueden utilizar diferentes tipos de materiales de sonicación a escala de laboratorio o industrial. El procedimiento de ultrasonidos de alta intensidad es el procedimiento más adecuado. Para preparar cantidades pequeñas, los materiales de 400 W o 600 W con ultrasonidos a 20 kHz ofrecen resultados satisfactorios y, por lo tanto, son los preferentes. El control electrónico de la temperatura y de la duración de emisión del procedimiento también se puede realizar con este tipo de dispositivos. Existen materiales del mismo tipo para usos industriales.

Los parámetros físicos, en particular el tiempo (3 a 5 minutos, en uno o más tiempos), dependen del material utilizado, del volumen de la mezcla y de la viscosidad de la misma. El experto en la técnica puede definir rápidamente tales parámetros. Más específicamente, la temperatura de la mezcla no debe exceder los 40 °C para evitar la degradación de los reactivos. La temperatura es preferentemente menor de unos 38 °C, incluso más preferentemente por debajo de los 35 °C.

#### AGITACIÓN MECÁNICA

Los materiales usuales utilizan propulsores cuyos movimientos rápidos generan turbulencias y remolinos, lo que permite

la interpenetración de las partículas, y la formación de nanopartículas dentro de la mezcla.

La velocidad de la agitación oscila preferentemente de 1000 a 5000 rpm. Los volúmenes aplicados, el dispositivo, la velocidad de agitación y la proporción W dependen del ingrediente terapéuticamente activo, y se deben adaptar a él.

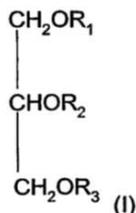
- 5 Como está descrito más arriba, la temperatura de la mezcla no debe exceder los 40 °C para evitar la degradación de los reactivos. La temperatura es preferentemente inferior a unos 38 °C, incluso más preferentemente por debajo de los 35 °C.

Componentes de las micelas inversas

ACILGLICEROL

- 10 Los acilgliceroles, más particularmente los acilgliceroles de ácidos grasos, útiles para la preparación del sistema micelar inverso de acuerdo con la invención, se pueden aislar de la mayoría de los animales y más preferentemente de las plantas.

Los acilgliceroles incluyen mono-, di- o triacilgliceroles. En una realización particular, los mono-, di- o triglicéridos preferentemente utilizados en la presente invención presentan la fórmula siguiente (I):



- 15 en la que:

- R<sub>1</sub> es un residuo acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, un átomo de hidrógeno, o una mono-, di- o trigalactosa o glucosa;

- R<sub>2</sub> es un resto acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 2 y 18 átomos de carbono;

- 20 - R<sub>3</sub> es un resto acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, o un átomo de hidrógeno.

De acuerdo con una realización preferente, al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub>, preferentemente sólo uno, representa un resto acilo de ácido oleico (C18: 1[cis]-9).

- 25 De acuerdo con un aspecto particular, R<sub>2</sub> tiene un enlace insaturado (p. ej., enlace etilénico) y tiene ventajosamente 18 átomos de carbono, preferentemente R<sub>2</sub> es un resto de ácido oleico (grupo oleoilo), uno de sus isómeros posicionales con respecto al doble enlace (cis-6,7,9,11 y 13), o uno de sus isómeros de ramificación iso.

De acuerdo con otro aspecto particular, R<sub>1</sub> representa un grupo oleoilo.

De acuerdo con otro aspecto particular, R<sub>2</sub> representa un grupo acetilo.

De acuerdo con una realización preferente, R<sub>3</sub> representa un átomo de hidrógeno.

- 30 Los aceites vegetales insaturados son particularmente ventajosos cuando se utilizan como fuente de acilgliceroles, especialmente el aceite de oliva del primer prensado en frío.

Como norma general, un aceite que contiene una concentración elevada de ácido oleico se elegirá como una fuente útil de acilgliceroles de acuerdo con la invención. Tal aceite normalmente contiene una proporción elevada de acilgliceroles útiles de acuerdo con la invención.

- 35 De acuerdo con un aspecto particular de la invención, los diglicéridos de ácidos grasos preferentes se seleccionan entre el grupo que consiste en 1,2-dioleína y 1-oleoil-2-acetilglicerol.

- 40 Un número determinado de ellos, y más particularmente los que se comprueba que son los más activos en las aplicaciones que se persiguen, también existen comercialmente. Este es el caso en particular del 1-oleoil-2-acetilglicerol y del 1,2-dioleoilglicerol, que existen como productos comerciales con un contenido de gran pureza. En particular, el monooleato de glicérido, que contiene aproximadamente el 44% de glicéridos dioleicos, de los cuales aproximadamente el 14% es 1,2-dioleína. Tal compuesto está farmacéuticamente aceptado (*Farmacopea Europea* (4.<sup>a</sup> edición), *USP*

25/NF20, y *Estándares y especificaciones japonesas para los aditivos alimentarios*). Tal producto está, por ejemplo, disponible comercialmente en la compañía Gattefossé con el nombre PECEOL®.

#### FITOESTEROLES

5 Los esteroides útiles para preparar el sistema micelar inverso de acuerdo con la invención son fitoesteroides (esteroides vegetales). El sitosterol es el fitoesterol preferente útil para el sistema micelar inverso de acuerdo con la invención.

10 El fitoesterol tiene muchas ventajas sobre el colesterol, ya que es capaz de atravesar la mucosa, en particular la mucosa de la boca y del recto. En consecuencia, las micelas inversas de la presente invención proporcionan un medio para solventar la incomodidad o el desagrado de la vía parenteral y, al mismo tiempo, impedir que el material se administre a través del estómago, que es un medio hostil para muchas sustancias, incluidas las proteínas. Por consiguiente, como medio de administración, las micelas inversas de la presente invención resultan muy ventajosas por permitir una absorción importante y homogénea del ingrediente activo a administrar.

El sitosterol incorporado en el sistema micelar inverso de la invención puede ser  $\beta$ - o  $\gamma$ -sitosterol, preferentemente  $\beta$ -sitosterol, o se puede introducir en forma de un extracto vegetal que contiene al menos una de estas dos formas de sitosterol.

15 Resulta particularmente posible utilizar diferentes productos comerciales. Más particularmente, se puede utilizar el sitosterol comercial que se extrae de la soja. En tal producto, el sitosterol generalmente representa del 50% al 70% en peso del producto y se encuentra generalmente en una mezcla con campesterol y sitostanol, cada uno con una proporción del orden del 15%. También se puede utilizar el sitosterol comercial que se extrae de una serie de pinos y se denomina aceite de pulpa de pino. En general, será posible utilizar el sitosterol en una mezcla con sitostanol.  
20 Preferentemente, dicha mezcla comprende al menos un 50% sitosterol en peso.

25 Uno será capaz de obtener un  $\beta$ -sitosterol que tenga una pureza mayor del 95%, o incluso del 99%, al proceder de la siguiente manera: se llevan a cabo varias retrocristalizaciones sucesivas de la mezcla comercial con acetona, lo que permite una purificación previa del  $\beta$ -sitosterol por eliminación del campestanol y del sitostanol presentes en la mezcla. A continuación se somete el producto así prepurificado a 1 a 3 etapas de purificación mediante cromatografía líquida de alta presión en una columna preparativa C18 utilizando mezclas de eluyente, tal como metanol, en particular metanol al 100% o mezclas de metanol y acetonitrilo, en particular mezclas 80-20 o cualquier mezcla intermedia, que hagan posible la obtención del sitosterol con una pureza mayor del 95% o incluso del 99%. Esta pureza se determina mediante cromatografía de gases.

30 El sitosterol y, por lo tanto, el sitostanol se pueden preparar también mediante extracción a partir de plantas de acuerdo con las técnicas de la bibliografía, por ejemplo, pág. 95 de la tesis presentada en Montpellier por Claude Cerdon titulada «Modulation de la production de sapogenines steroïdiques en reponse a l'inhibition de la synthese de sterols».

Esta extracción se lleva a cabo ventajosamente mediante la formación de complejos con metales, de acuerdo con el método descrito en particular en la patente francesa n.º FR 2 316 247 en la que se describe un método para aislar 3-hidroxi-esteroides y 3-oxo-esteroides a partir de una mezcla que contiene estos compuestos.

35 Para efectuar esta extracción, se puede utilizar cualquier planta o producto de origen vegetal conocido por su contenido relativamente elevado de sitosterol.

40 A modo de ejemplos de plantas o productos de origen vegetal con un contenido de sitosterol libre relativamente elevado se pueden mencionar en particular el aceite de oliva, el aceite de soja, las hojas de algodón, las hojas de café, el germen de trigo, para los cuales el contenido de fitoesterol libre y el porcentaje de sitosterol en la fracción de fitoesterol libre se dan en la siguiente tabla:

ESPECIE	contenido/kg	% de la fracción de fitoesterol
Aceite de oliva	1310 mg	91%
Aceite de soja	1908 mg	53%
Hojas de algodón	3961 mg	93%
Hojas de café	9914 mg	51%
Germen de trigo	17336 mg	67%

El porcentaje se expresa en peso.

No se ha estudiado el contenido relativo de sitostanol. También conviene señalar que la fracción de fitoesterol libre contiene una proporción de los isómeros 24 R y 24S, que varía según la planta. Esta proporción no se conoce bien, porque se ha estudiado poco, cuando se ha estudiado.

45 Esta proporción así como la cantidad relativa de sitostanol, que no se puede separar del sitosterol durante la purificación, podría explicar la mejor actividad relativa de la fracción de fitoesterol de algunas plantas y, especialmente,

el exceso de sitosterol necesario para la preparación del sistema micelar inverso descrito en la invención.

- Tal y como se mencionó anteriormente, las proporciones de fitoesterol y acilglicerol pueden variar considerablemente, por ejemplo, la proporción en peso de fitoesterol/acilglicerol puede oscilar de 0,01 a 1 (inclusive). De acuerdo con una realización particular, se puede utilizar más acilglicerol (preferentemente diacilglicerol de ácidos grasos) que fitoesterol (preferentemente sitosterol). Más particularmente, la proporción en peso de fitoesterol/acilglicerol es mayor o igual a 0,1, más preferentemente de 0,1 a 0,2.

#### COMPUESTO ACTIVO TERAPÉUTICO

- Se puede utilizar cualquier agente terapéutico hidrosoluble en la presente invención. Incluyen, pero sin limitarse a ellos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos [ADN o ARN (más particularmente ARNi) o fragmentos de los mismos] y composiciones farmacéuticas acuosas.

En la presente invención se utilizan más preferentemente proteínas con un interés terapéutico particular. Dado que tales ingredientes activos son inestables en el medio biológico, en particular se pueden degradar mediante las enzimas endógenas en el tubo digestivo, se suelen administrar por una vía inyectable.

- Los agentes de interés de acuerdo con la invención son cualquier proteína terapéutica o glucoproteína, tal como insulina, eritropoyetina, leptina, factores de crecimiento, hormonas de liberación de la hormona del crecimiento, factores estimuladores de colonias, hormonas hidrosolubles (hormona paratiroidea o fracciones o análogos de la misma), luliberina (LHRH) o análogos de la misma (p. ej., nafarelina, busarelina, goserelina), polisacáridos (tal como heparina), interferones, compuestos similares a la heparina, y citocinas. También incluye ADN, fragmentos de ARN o plásmidos, ARN interferente, agentes inmunógenos y/o de vacunación, etc.

- Tal agente incorporado en el sistema micelar inverso de acuerdo con la invención puede atravesar las barreras epiteliales mucosas y presentar gracias a ello su efecto terapéutico en el sitio de destino.

El ingrediente activo hidrosoluble está más preferentemente presente en el núcleo acuoso de las micelas inversas.

- La estabilidad y la actividad del agente terapéutico se puede controlar esencialmente mediante la concentración de agua en la mezcla. Se han llevado a cabo estudios con enzimas disueltas en la fase acuosa y demuestran que la actividad enzimática se puede optimizar y que la reacción de la cinética depende de la concentración relativa de agua.

La cantidad de los ingredientes activos que se incorporan en el sistema de micelas inversas se determina por su solubilidad en la fase hidrófila (núcleo acuoso). Preferentemente, la cantidad del agente terapéutico incluido en el sistema de micelas inversas depende del ingrediente activo.

#### Utilización del sistema micelar inverso

- Las micelas inversas de la invención mejoran la biodisponibilidad del ingrediente activo incluido en éstas, lo que permite su uso terapéutico en el sitio de destino con una toxicidad reducida. Debido a su naturaleza de microemulsión, el sistema micelar inverso permite proporcionar diferentes tipos de formulaciones, que comprenden excipientes, vehículos o diversos soportes, que se pueden administrar por distintas vías, incluida a través de la mucosa, tal como por administración oral o rectal.

- Hoy en día se sabe que el sistema micelar inverso se puede utilizar para preparar nanomateriales, los cuales actúan como microrreactores. Pueden albergar proteínas tales como enzimas. Las reacciones catalíticas con los sustratos insolubles en agua se pueden producir en la gran interfase interna entre aceite y agua dentro de la microemulsión. Se puede controlar la actividad y la estabilidad de las biomoléculas, principalmente mediante la concentración de agua en este medio.

- La incorporación de agentes terapéuticos en un sistema micelar inverso proporciona las ventajas siguientes: dichos agentes se vuelven más estables, se pueden absorber a través de la mucosa, el transporte de las micelas en el medio sanguíneo no se ve alterado, y se obtiene un efecto biológico óptimo de los ingredientes activos en el sitio de destino.

Un objetivo de la invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende micelas inversas como quedan definidas anteriormente y un vehículo, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

- Un objetivo más de la invención se refiere al uso de micelas inversas como quedan definidas anteriormente para preparar una composición farmacéutica diseñada para la administración, más específicamente para la administración a través de la mucosa, de uno o más agentes activos terapéuticos hidrosolubles. La composición farmacéutica está diseñada más en particular para prevenir o tratar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno.

- Otro objetivo de la invención se refiere a los métodos para la administración de uno o más agentes activos terapéuticos hidrosolubles a un mamífero (en particular, a un humano), comprendiendo dichos métodos la administración de dicha composición de micelas inversas como la definida anteriormente. En una realización específica, la presente invención

da a conocer métodos para la administración a través de la mucosa de uno o más agentes activos terapéuticos hidrosolubles, comprendiendo dichos métodos la administración a través de la mucosa a dicho mamífero (en particular, a un humano) de una composición de micelas inversas como la definida anteriormente.

- 5 La presente invención da a conocer métodos para la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o trastorno en los humanos, comprendiendo dichos métodos la administración a dicho humano que lo necesita de una cantidad eficaz de una composición de micelas inversas como la definida anteriormente y que comprende uno o más agentes terapéuticos hidrosolubles útiles para la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad o trastorno. En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o trastorno, comprendiendo dichos métodos la administración a través de la mucosa a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de una composición de micelas inversas como la definida anteriormente y que comprende uno o más agentes terapéuticos hidrosolubles útiles para la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad o trastorno.

- 15 En particular, el agente activo terapéutico hidrosoluble es como se definió anteriormente, e incluye una proteína, polipéptido, péptido, glucoproteína, polisacárido, un ácido nucleico como el identificado anteriormente, o mezclas de los mismos.

Cuando los polipéptidos y péptidos son, por ejemplo, insulina, interferones y citocinas, las enfermedades tratadas son más específicamente diabetes, hepatitis y neoplasias malignas, respectivamente.

- 20 Cuando se utilizan agentes inmunógenos y/o de vacunación, se puede utilizar el sistema micelar inverso de la invención derivado de ellos como una vacuna.

- Como excipiente, vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable, se puede utilizar cualquier vehículo o transportador bien conocido por la persona experta en la técnica. Lo siguiente se puede citar como ejemplos sin que resulten limitantes: lactosa, almidón de maíz, glucosa, sacarosa, edulcorantes tales como jarabe de malitol, goma arábiga, gelatina, carragenanos, ácido esteárico, estearato de magnesio, dextrina, maltodextrinas, manitol, talco, grasas de origen natural, particularmente aceites de origen vegetal ricos en ácidos grasos insaturados y fitoesteroles. En particular, si fuera finalmente necesario, se pueden utilizar otros aditivos bien conocidos para la persona experta en la técnica, tales como estabilizantes, desecantes, aglutinantes o tamponantes del pH. Los excipientes preferentes de acuerdo con la invención favorecen la adherencia del producto acabado a la mucosa.

- 30 Las composiciones de la invención se pueden administrar de diferentes modos, en particular a través de la vía oral, con una absorción bucal o digestiva, o de manera más general a través del tejido de la mucosa de la boca.

- 35 Tal y como se utilizan en la presente memoria, la terminología «mucosa» se refiere a un tejido mucoso tal como epitelio, lámina propia y una capa del músculo liso en el tubo digestivo. «Administración por la mucosa», «administración a través de la mucosa» y la terminología análoga se utiliza en la presente memoria para referirse a la administración de una composición al tejido mucoso. «Administración por la mucosa», «administración a través de la mucosa» y la terminología análoga incluye, pero sin limitarse a ellas, la administración de una composición a través de los tejidos mucosos bronquial, gingival, lingual, nasal, oral, vaginal, rectal e intestinal.

- 40 En una realización preferente de la invención, las composiciones de micelas inversas de la invención se administran por la mucosa como una cápsula, comprimido oblongo, aerosol, atomizado, solución, suspensión, emulsión, sello, comprimido, cápsula de gelatina elástica suave, polvo o gránulo. Las composiciones de la invención se pueden introducir en forma de líquido dentro de cápsulas que liberan su contenido en la boca. Preferentemente, las composiciones de micelas inversas de la invención se administran a un mamífero, más preferentemente a un humano, para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno.

Los siguientes ejemplos pretenden ejemplificar el funcionamiento de la presente invención, pero no limitar su alcance.

### Ejemplos

- 45 Ejemplo 1: Preparación de un sistema de administración por transporte para administrar insulina por una vía rectal a un animal:

A 1 g de sitosterol solubilizado en 2 ml de etanol se le añade 1 ml de agua purificada que comprende 100 UI de insulina (Umuline Zn de liberación prolongada) y luego 40 ml de Peceol® (monooleato de glicérido disponible comercialmente en Gattefossé).

- 50 La sonicación de la mezcla se lleva a cabo en dos tiempos (de 3 minutos cada uno), vigilando que la temperatura esté a menos de 35 °C.

El producto obtenido está constituido por una mezcla homogénea de nanomicelas inversas estables que contienen insulina.

Entonces se puede administrar a un animal a 2 ml/kg por vía rectal [5 UI/(24 h · kg) de insulina Zn].

Ejemplo 2: Preparación de un sistema de administración por transporte para la administración oral de insulina a un sujeto:

- 5 A 10 g de sitosterol solubilizado en 10 ml de etanol se le añaden 2 ml de agua purificada que contiene 200 UI de insulina (Umuline de liberación prolongada) y luego 28 ml de Peceol®.

La sonicación de la mezcla se lleva a cabo en dos tiempos (de 3 minutos cada uno), vigilando que la temperatura esté a menos de 35 °C.

- 10 El producto obtenido está constituido por una mezcla homogénea de nanomicelas inversas estables que contienen insulina. Se introduce en cápsulas, cada una con 1 g del producto obtenido (5 UI de insulina de actuación rápida por cápsula). A continuación se puede administrar a una persona que necesita insulina. Dicha persona rompe la cápsula en la boca y el líquido que sale de ella lo mantiene durante un minuto en la boca (de modo que el sitosterol de la mezcla se adhiera a la mucosa de la boca y permita una absorción rápida).

Ejemplo 3: Preparación de un sistema de administración por transporte para la administración oral de la eritropoyetina a un sujeto:

- 15 Se mezclan 10 g de sitosterol solubilizado en 10 ml de etanol, 2 ml de una disolución acuosa que contiene 80 000 UI de eritropoyetina (40 000 UI/ml de EPREX), y entonces 28 ml de Peceol®.

Se agita la mezcla con un agitador con superficie calefactora a 1200 rpm, vigilando que la temperatura esté a menos de 35 °C.

- 20 El producto obtenido está constituido por una mezcla homogénea de nanomicelas inversas estables que contienen eritropoyetina. Se introduce en cápsulas, cada una con 1 g del producto obtenido (1000 UI de eritropoyetina por cápsula). Entonces se puede administrar a una persona que necesite eritropoyetina. Dicha persona rompe la cápsula en la boca y mantiene el líquido obtenido de ésta durante un minuto en la boca (de modo que el sitosterol de la mezcla se adhiera a la mucosa de la boca y permita una absorción rápida).

Ejemplo 4: Preparación de micelas inversas que contienen eritropoyetina

- 25 A 3 g de sitosterol solubilizado en 4,5 ml de etanol se le añaden 1 ml de EPREX® que contiene 2000 UI de EPO y 72 ml de Peceol®.

Se agita la mezcla con un agitador magnético calentando a 35 °C durante 15 minutos.

La proporción W es 0,04.

Entonces se puede administrar a las ratas a 2 ml/kg por vía rectal (50 UI/kg).

- 30 Ejemplo 5: Preparación de micelas inversas que contienen eritropoyetina

A 3 g de sitosterol solubilizado en 4,5 ml de etanol se le añaden 2 ml de EPREX® que contienen 4000 UI de EPO y 72 ml de Peceol®.

Se agita la mezcla con un agitador magnético calentando a 35 °C durante 15 minutos.

La proporción W es 0,08.

- 35 Entonces se puede administrar a las ratas a 2 ml/kg por vía rectal (100 UI/kg).

Ejemplo 6: Preparación de un sistema de administración por transporte para la administración intrarrectal de micelas inversas que contienen plásmido, y su administración

Se mezclan 125 µg de sitosterol solubilizado en 200 µl de etanol, 250 µl de una disolución acuosa que contiene 3 mg del plásmido pEGFP-N1, y luego 4,75 ml de Peceol®.

- 40 Se agita la mezcla con un agitador de superficie calefactora a 1200 rpm, vigilando que la temperatura esté a menos de 35 °C.

El producto obtenido es una mezcla homogénea de nanomicelas inversas estables que contienen el plásmido.

Productos administrados

Las micelas inversas con pEGFP-N1 se preparan como se describió anteriormente.

pEGFP-N1 (comprado a Clontech) es un vector de expresión en mamíferos para la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) que se utiliza después de introducirlo por transformación en las células competentes Top10 de *Escherichia coli* (Invitrogen) y purificarlo con el EndoFree Plasmid Mega Kit de Qiagen Ltd. según las instrucciones del fabricante.

5 Métodos

A ocho ratas (Wistar, 250-300 g) se les inyectó por vía rectal 500 µl del producto.

Se recogieron muestras de sangre a los 1, 2, 4 y 8 minutos de la inyección (2 ratas por tiempo) en tubos con anticoagulante. Después de centrifugar a 1500 rpm durante 25 minutos, se utilizó el plasma para los estudios de transfección.

- 10 HepG2 (estirpe celular de hepatoma humano) y CV1 (estirpe celular de fibroblastos de riñón de mono) se mantienen en un medio de Eagle modificado de Dulbecco complementado con suero de ternera fetal al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se inoculan a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 24 pocillos 24 horas antes de los estudios de transfección.

- 15 Para la transfección se retira el medio de cultivo y se añaden 200 µl de plasma de rata con las micelas inversas, que contienen el plásmido pEGFP-N1, a las diferentes placas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de añadir 500 µl de medio nuevo, se cultivan las células durante 48 horas antes de medir la expresión génica al microscopio de fluorescencia mediante la determinación del porcentaje de las células fluorescentes.

- 20 El control negativo de plasma corresponde a la muestra de rata que no recibió la inyección de micelas inversas que contenían el plásmido pEGFP-N1. Se utiliza FuGENE™ (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante, como control positivo de la transfección.

Resultados

% de transfección obtenida (% de células fluorescentes)

Estirpe celular	1'	2'	4'	8'	FuGENE™
Hepatoma humano (HepG2)	0	8%	18%	6%	10%
Fibroblastos de riñón de mono (CV1)	0	14%	28%	10%	25%

Ejemplo 7: Prueba farmacológica: bioactividad de la eritropoyetina

- 25 La eritropoyetina (EPO) es el principal regulador de la eritropoyesis humana. La masa molecular de la EPO es de 30-34 kDa.

La EPO recombinante se produce comercialmente mediante la expresión en clones con el ADNc de la EPO de estirpes celulares eucarióticas de ovario de hámster chino.

- 30 La determinación temprana de la potencia de la EPO<sub>rh</sub> se llevó a cabo en ratas y ratones normales siguiendo al aumento de varios parámetros, tales como hematocrito, volumen de glóbulos rojos y número de reticulocitos. Las investigaciones recientes estiman que el número de reticulocitos en circulación es un indicador temprano del estado funcional de la eritropoyesis, y la estimación del porcentaje de reticulocitos en la sangre periférica se ha utilizado para valorar la bioactividad de la EPO.

Productos

- 35 EPREX, producido por el laboratorio JANSSEN-CILAG: 2000 UI/ml

Lote A: 50 UI/kg de EPO: una dosis única por vía subcutánea

Lote B: 100 UI/kg de EPO: una dosis única por vía subcutánea.

Lote C: 50 UI/kg de EPO: una dosis única por vía rectal (ejemplo 4)

Lote D: 100 UI/kg de EPO: una dosis única por vía rectal (ejemplo 5)

- 40 Protocolo

Los ratones normocitémicos de 8 semanas de edad recibieron una dosis única del producto y 96 h después se les tomó una muestra de sangre. Los experimentos se llevan a cabo con 3 ratas por lote.

El recuento de los reticulocitos se realiza con un citómetro de flujo automático.

Resultados

Productos	Reticulocitos (%)	Coefficiente de variación (%)
Lote A: 50 UI/kg de EPO s.c.	10,69	15,79
Lote B: 100 UI/kg de EPO s.c.	11,24	18,51
Lote C: 50 UI/kg de EPO por vía rectal	6,19	13,67
Lote D: 100 UI/kg de EPO por vía rectal	11,93	16,70

Conclusiones

- 5 Los productos C y D (micelas inversas con eritropoyetina) tienen un impacto significativo sobre la eritropoyesis, equivalente a la EPO administrada por vía subcutánea.

Ejemplo 8: ENSAYO IN VIVO: modelos de ratas STZ diabéticas; insulina de liberación prolongada

El producto utilizado es el preparado de acuerdo con el ejemplo 1.

- 10 Propósito del estudio: comparar la actividad hipoglucémica de la insulina de liberación prolongada cuando se administra por vía subcutánea con la misma dosificación que la insulina incorporada en las micelas inversas de acuerdo con la invención administrada por la vía rectal.

Comentarios sobre las vías de administración:

- 15 Los productos que contienen nanopartículas lipídicas se degradan en el estómago y el duodeno, en particular por las lipasas. La administración a un sujeto se lleva a cabo preferentemente en la boca por absorción a través de la mucosa. Dado que este modo de administración no está disponible con las ratas, se ha seleccionado la vía rectal porque permite una absorción a través de la mucosa tan eficaz como una administración oral. Las sustancias absorbidas por la vía rectal no alcanzan el hígado, como ocurre con las sustancias administradas por vía oral y que pasan al torrente sanguíneo a través del tejido mucoso.

Vía de administración:

- 20 Lote 2: subcutánea

Lote 3: rectal

Productos administrados:

Lote 2: 5 UI/kg de Umulin Zn

Lote 3: NP X: 5 UI/kg de Umulin Zn en el vector micelar (ejemplo 1)

- 25 Cantidad administrada: 2 ml/(kg · día) vía sonda rectal

Método:

- 30 La administración de estreptozotocina (STZ) a las ratas macho Wistar (peso: 250-300 g) por vía intravenosa a una dosis de 50 mg/kg proporciona una diabetes intermedia entre una diabetes insulino dependiente y una diabetes insulino independiente (tipo 1 y 2). A los 3 días de la administración, la glucemia se encontraba entre 20 y 30 mmol/l y permaneció casi estable durante los siguientes 7 días.

Las sustancias se administran diariamente durante 7 días, y se realizan ensayos biológicos de la glucemia en las muestras de sangre recogidas a los días 0, 3 y 7 del comienzo del tratamiento.

Resultados:

Lote 1 (control)

Ratas	D 0	D 0	D 3	D 3	D 7	D 7
n.º	Peso	Glucemia	Peso	Glucemia	Peso	Glucemia

## ES 2 360 809 T3

25	261	24,96	234	28,13	223	23,05
31	226	28,56	194	29,21	191	24,22
32	262	11,36	259	15,31	260	13,30
34	288	19,64	208	19,83	199	18,54
50	252	22,99	250	22,39	256	26,46
66	255	18,62	242	16,69	240	14,59

### Lote 2 (Umulin Zn)

Ratas	D 0	D 0	D 3	D 3	D 7	D 7
n.º	Peso	Glucemia	Peso	Glucemia	Peso	Glucemia
52	264	25,41	301	5,99	302	6,01
72	220	28,66	201	3,97	221	4,30
73	239	28,25	221	5,28	210	5,21
74	221	28,45	210	4,48	220	4,78
75	227	29,20	215	4,51	213	4,64
77	230	30,77	221	5,06	220	5,05

### Lote 3: NP X (nanopartículas de Umulin Zn)

Ratas	D 0	D 0	D3	D3	D7	D7
n.º	Peso	Glucemia	Peso	Glucemia	Peso	Glucemia
60	242	22,56	230	6,09	225	7,43
61	213	27,45	200	12,78	197	7,08
62	258	21,63	241	9,36	238	7,71
63	241	19,27	231	7,85	228	15,79
64	224	26,12	215	21,41	215	15,30
65	235	14,44	219	8,68	218	9,39

5

### Conclusiones:

- La insulina Zn administrada por vía subcutánea (lote 2) a una dosis diaria de 5 UI/kg devuelve la glucemia a la tasa normal.

10 - El producto NP X (nanopartículas de insulina Zn, lote 3) tiene un impacto significativo sobre la glucemia: 72 h después del comienzo del tratamiento, 4 de los 6 animales han vuelto a una glucemia normal equivalente a la conseguida con una insulina administrada por vía subcutánea. La biodisponibilidad de la insulina para dichos animales es similar a la biodisponibilidad de la insulina cuando se administra por inyección.

15 La ligera diferencia de los resultados para la insulina inyectable en los dos animales se debe a las dificultades que se suelen encontrar para la administración por vía rectal en los animales. La administración oral en un humano permite evitar tales dificultades.

### Ejemplo 9: ENSAYO IN VIVO: modelos de ratas STZ diabéticas; insulina de acción rápida

Propósito del estudio: comparar la actividad hipoglucémica y la biodisponibilidad de la insulina de acción rápida cuando se administra por vía subcutánea con la misma dosis de insulina que se incorpora en las micelas inversas de acuerdo

con la invención administradas por vía rectal.

Protocolo

Se induce la diabetes en las ratas macho Wistar (peso: 150 a 200 g) mediante inyección i.v. de estreptozotocina (60 mg/kg). Después de 4 días, las ratas tratadas exhiben una diabetes insulino dependiente acompañadas, después de varios días, de una resistencia a la insulina. Los experimentos se llevan a cabo en 3 ratas por lote.

Sólo se realiza una administración, por vía subcutánea para el producto de referencia, y por vía rectal para los productos de micelas (Mc) analizados.

La dosis de insulina es la misma para los productos de referencia y los productos de Mc analizados: 5 UI/kg.

Grupos de tratamiento

- 10 - Grupo de control sin tratar con STZ
  - Grupo de insulina de acción rápida (UMULINE de acción rápida), vía subcutánea
  - Grupo de insulina de acción rápida (UMULINE de acción rápida), vía rectal
  - Grupo de insulina de acción rápida (UMULINE en Mc) por vía rectal
  - Grupo de formulación de Mc sin insulina por vía rectal
- 15 Los ensayos de la glucemia y la insulinemia se realizan en 7 momentos de tiempo: 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 360 min y 24 horas.

Resultados

Glucemia (mmol/l)

Tiempo (min)	0	15	30	60	120	180	360	1440
<b>Control</b>	19,98	20,13	21,59	21,37	20,18	19,65	18,91	19,68
Desviación estándar	0,73	0,81	0,17	0,15	0,19	0,46	0,87	0,46
<b>UMULINE rápida s.c.</b>	21,76	17,57	9,25	4,82	3,59	4,44	19,22	21,91
Desviación estándar	1,22	1,19	2,33	0,94	0,72	1,41	2,37	1,02
<b>UMULINE en Mc</b>	21,89	20,6	17,53	13,69	10,45	9,85	20,14	20,76
Desviación estándar	0,97	1,19	1,38	1,15	1,21	1,02	2,58	1,17
<b>Control de STZ</b>	3,3	4	3,7	4,3	4,7	4,3	5	4,3
Desviación estándar	0,3	0,6	0,3	0,7	0,9	0,3	0,6	0,3
<b>UMULINE rápida s.c.</b>	4,3	12,3	52,7	67,7	84,3	79,3	11,7	4
Desviación estándar	0,7	1,5	2,8	7,4	4,4	7,5	1,5	0,6
<b>UMULINE en Mc rectal</b>	4	4,7	9	16,7	29	31	10,3	5
Desviación estándar	0,6	0,9	1,2	1,9	5,6	2,1	1,3	1

20 Conclusión

La cinética de absorción de Mc por vía rectal es comparable a la de la vía subcutánea para la insulina rápida: T<sub>máx</sub> = 2-3 horas.

Las cinéticas de eliminación son comparables.

La biodisponibilidad relativa de la formulación de Mc en comparación con la vía subcutánea es del 55%, según el ABC.

25 Ejemplo 10: Optimización de la cantidad de agua incorporada

Protocolo

Se prepararon muestras que contienen cantidades relativas de Peceol<sup>®</sup>, sitosterol y etanol dadas en los ejemplos anteriores variando la cantidad de agua en la que se solubilizan las proteínas. Se hizo una escala de dilución aumentando la cantidad de agua a incrementos del 0,3%.

- 5 Se homogeneizaron las muestras agitando a 35 °C, como se describió más arriba.

Se determinó el impacto de la cantidad de agua sobre la estabilidad del sistema micelar inverso de forma visual (turbidez) y mediante difracción de rayos x de ángulo agudo.

Resultados

- 10 A partir de agua al 6,9% en la composición (a saber, el W es de aproximadamente 0,175) y más, la microemulsión se vuelve cada vez más turbia y aparecen dos fases cuando se va aumentando la cantidad de agua. El porcentaje de agua se expresa en peso de toda el agua:peso total de la composición.

## REIVINDICACIONES

1.- Sistema micelar inverso que se obtiene mediante el método siguiente:

a) poner en contacto i) fitoesterol, ii) acilglicerol, iii) agua y iv) al menos un ingrediente terapéuticamente activo hidrosoluble,

5 b) agitar la mezcla obtenida en la etapa a) a 40 °C o menos, y durante un tiempo suficiente para que se formen las micelas inversas, llevándose a cabo dicha agitación mecánicamente a una velocidad de 1000 a 5000 rpm o mediante sonicación.

2.- Sistema micelar inverso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proporción  $W = (\text{agua})/(\text{acilglicerol})$  es preferentemente menor o igual a aproximadamente 2,5.

10 3.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción en peso de fitoesterol/acilglicerol oscila de 0,01 a 1.

4.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción en peso de fitoesterol/acilglicerol es mayor o igual a 0,1, más preferentemente de 0,1 a 0,2.

15 5.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la agitación de la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura que oscila de 30 °C a 38 °C.

6.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción  $W = (\text{agua})/(\text{acilglicerol})$  es menor o igual a aproximadamente 1.

7.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el acilglicerol presenta la fórmula siguiente (I):



20

en la que:

-  $R_1$  es un resto acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, un átomo de hidrógeno, o una mono-, di- o trigalactosa o glucosa;

25 -  $R_2$  es un resto acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 2 y 8 átomos de carbono;

-  $R_3$  es un resto acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, o un átomo de hidrógeno.

8.- Sistema micelar inverso de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que al menos uno de  $R_1$  y  $R_3$ , preferentemente sólo uno de  $R_1$  y  $R_3$ , representa un resto acilo de ácido oleico (C18: 1[cis]-9).

30 9.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 anteriores, en el que  $R_2$  es un resto de ácido oleico (grupo oleilo), uno de sus isómeros posicionales con respecto al doble enlace (cis-6,7,9,11 y 13) o de uno de sus isómeros con ramificación iso.

10.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 y 8 anteriores, en el que  $R_2$  representa un grupo acetilo.

35 11.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 anteriores, en el que  $R_3$  representa un átomo hidrógeno.

12.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 anteriores, en el que el acilglicerol se selecciona entre el grupo que consiste en 1,2-dioleína y 1-oleoil-2-acetilglicerol

40 13.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 anteriores, en el que el fitoesterol es sitosterol.

- 14.- Sistema micelar inverso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 anteriores, en el que el agente terapéutico hidrosoluble es un péptido, un polipéptido, proteína, ácido nucleico [ADN o ARN (más particularmente ARNi) o fragmentos de los mismos] o una composición farmacéutica acuosa.
- 5 15.- Sistema micelar inverso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el agente terapéutico hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en insulina, eritropoyetina, leptina, factores de crecimiento, hormonas liberadoras de la hormona de crecimiento, factores estimuladores de colonias, hormonas hidrosolubles (hormona paratiroidea o fracciones o análogos de la misma), luliberina (LHRH) o análogos de la misma (p. ej., nafarelina, buserelina, goserelina), interferones, citocinas, polisacáridos (p. ej., heparina), compuestos similares a la heparina, ADN, fragmentos de ARN o plásmidos, ARN interferente y agentes inmunógenos y/o de vacunación.
- 10 16.- Composición farmacéutica que comprende micelas inversas como quedan definidas en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un soporte farmacéuticamnte aceptable.