



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 365 315**

⑫ Número de solicitud: 201030399

⑤① Int. Cl.:
C08F 26/06 (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **18.03.2010**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2011**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.09.2011

⑦① Solicitante/s: **Universidad del Pais Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES
Eindhoven University of Technology y
Universidad de Granada**

⑦② Inventor/es: **Forcada García, Jacqueline;
Imaz Makazaga, Ainara;
San Martín Sáez, Andoni;
Van Herk, Alex M.;
Heuts, Johannes A. P. y
Ramos Julián, José**

⑦④ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤④ Título: **Nanogeles catiónicos para aplicaciones biotecnológicas.**

⑤⑦ Resumen:

Nanogeles catiónicos para aplicaciones biotecnológicas. La presente invención se dirige a un nanogel catiónico biocompatible que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica es obtenible por polimerización en medio disperso de N-vinilcarprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico. La invención se dirige asimismo a procedimientos para la obtención de los mencionados nanogeles así como a composiciones farmacéuticas que los comprenden.

ES 2 365 315 A1

DESCRIPCIÓN

Nanogeles catiónicos para aplicaciones biotecnológicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con unos nanogeles catiónicos biocompatibles y termosensibles, así como con un procedimiento para su producción y con composiciones farmacéuticas que comprenden dichos nanogeles. Entre otras aplicaciones, los nanogeles de la invención pueden ser utilizados como vehículos de transporte y liberación de
10 agentes biológicamente activos.

Antecedentes de la invención

En las últimas décadas, las dispersiones poliméricas acuosas preparadas mediante procesos de polimerización en medio disperso que conducen a la producción de partículas poliméricas con tamaños comprendidos dentro del rango coloidal, han suscitado un creciente interés tanto desde el punto de vista académico como industrial (Forcada J. e Hidalgo, R., *Curr. Org. Chem.* 2005, 9, 1067-1084). Estas nanopartículas se utilizan en una gran variedad de aplicaciones que van desde los adhesivos, los recubrimientos en base agua, papel, textil, aditivos, floculantes, etc.
20 También son adecuadas como material polimérico fino o de alto valor añadido para tests de diagnóstico médico, purificación de anticuerpos, sistemas de liberación de fármacos y como material para calibrado.

Un tipo particular de estos sistemas coloidales son los nanogeles. Los nanogeles son partículas coloidales entrecruzadas que pueden hincharse por absorción de grandes cantidades de disolvente, pero que no se disuelven debido a la estructura de la red polimérica física o químicamente entrecruzada que los constituye.
25

Los nanogeles exhiben un comportamiento que abarca desde el de una disolución polimérica (estado hinchado) hasta el de una partícula “dura” (estado colapsado). Pueden responder a estímulos físicos (temperatura, fuerza iónica, campos magnéticos, eléctricos, etc.), químicos (pH, iones y moléculas específicas, etc.) y bioquímicos (sustratos enzimáticos, ligandos de afinidad, etc.). De entre todos ellos, la temperatura es el más estudiado ya que supone un estímulo muy efectivo en muchas aplicaciones. Los nanogeles capaces de sufrir un cambio volumétrico de fase al cambiar la temperatura del medio en el que están dispersos, o nanogeles sensibles a la temperatura, son muy interesantes en aquellas aplicaciones biotecnológicas en las que se necesite dosificar un principio activo, molécula o material en medios en los que la principal variable sea la temperatura. Además, se ha constatado que las partículas de nanogel son capaces de responder a los estímulos de una forma mucho más rápida que sus homólogos geles macroscópicos, los hidrogeles, debido a su pequeño tamaño [Couvreur P. y col., *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, Guiot, P.; Couvreur, P., ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 27-93, 1986]. Por lo tanto, el tamaño de las partículas que forman el nanogel es un parámetro muy importante puesto que gobierna la eficacia del sistema de liberación.
35

Los nanogeles empleados como vehículos de transporte y liberación de moléculas o material biológicamente activo deben permanecer químicamente inalterados y ser farmacológicamente estables durante su tránsito desde el lugar de administración hasta la diana donde van a ejercer su efecto. Asimismo, las características del vehículo deben ser tales que no sólo sea compatible con el recorrido que tenga que realizar, sino también con el lugar de dosificación, es decir, que sea “inteligente” y libere el ingrediente activo en el momento preciso cuando haya llegado a la diana y que permita la biodisponibilidad del mismo. Por otra parte, el portador o vehículo no solo debe mantener sus características y propiedades en medio acuoso sino que también debe ser capaz de mostrar de nuevo sus propiedades si para la aplicación y/o transporte es necesario que se almacene en estado seco (liofilizado). Es decir, una vez redispersado, debe volver a manifestar sus propiedades y comportamiento frente a los cambios de temperatura.
45

La familia de polímeros más empleada en la síntesis de microgeles y nanogeles sensibles a las condiciones del medio es la de las poli(alquilacrilamidas) sensibles a la temperatura, más concretamente la poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM). Sin embargo, la toxicidad de las poli(alquilacrilamidas) impide su empleo en aplicaciones biomédicas. A pesar de esto, son muchos los artículos y documentos de patente publicados durante estos últimos años sobre este tipo de sistemas. En particular, se han descrito nanogeles que presentan un carácter catiónico. Así, Moselhy, J. y col. (*Int. J. Nanomedicine* 2009, 4, 153-164) describen nanogeles catiónicos termosensibles basados en una red polimérica de *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) o de un copolímero de ésta con 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA) y su potencial uso como vehículos de liberación de ADN; Eke, I. y col. (*Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2006, 279, 247-253) describen microgeles catiónicos sensibles tanto al pH como a la temperatura sintetizados a partir de *N*-isopropilacrilamida y *N*-3-dimetil-aminopropilmetacrilamida (DMAPM) y su uso en el desarrollo de nuevas superficies relacionadas con aplicaciones biotecnológicas; WO 2006/102762 propone una técnica para injertar grupos ácido borónico en microgeles de PNIPAM con grupos carboxilo, los cuales se utilizan para liberar de forma controlada insulina; Nolan, C.M. y col. (*Biomacromolecules* 2006, 7(11), 291 8-2922) también investigan la liberación de insulina a partir de microgeles de PNIPAM empleando ¹H RMN de temperatura variable; Sahiner, N. y col. (*Colloid Polym. Sci.* 2006, 284, 1121-1129) hacen referencia a la obtención de micro y nanogeles catiónicos sensibles al pH mediante polimerización de cloruro de (3-acrilamidopropil)-trimetilamonio (APTMAC) y a sus numerosas aplicaciones dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, en particular, su utilidad como vehículos de liberación controlada de moléculas activas.
50
55
60
65

Dentro de los monómeros biocompatibles y sensibles a la temperatura se encuentra la *N*-vinilcaprolactama (VCL) [Vihola, H. y col. *Biomaterials* 2005, 26, 3055-3064], que es un monómero soluble en agua. Su correspondiente polímero, la poli *N*-vinilcaprolactama (PVCL) combina propiedades muy útiles e importantes ya que además de ser biocompatible, cuenta con una transición de fase en la región de la temperatura fisiológica (32-38°C). Esta combinación de propiedades permite considerarla como un material adecuado para el diseño de dispositivos biomédicos y utilizable en sistemas de liberación de fármacos. Así por ejemplo, el documento WO 2008/145612 describe la obtención de microgeles amónicos de *N*-vinilcaprolactama adecuados como sistema de liberación de principios activos que experimentan un cambio volumétrico de fase progresivo, que va desde el estado hinchado al colapsado al aumentar la temperatura del medio en el que están dispersos.

No obstante, ninguno de los nanogeles descritos en el estado de la técnica, tanto catiónicos como aniónicos, manifiesta una respuesta inmediata al cambio de temperatura en la región de transición de fase, y menos aún que dicha respuesta suponga un cambio volumétrico de manera que el nanogel pase del estado colapsado al hinchado al aumentar la temperatura.

Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han observado que un nanogel catiónico constituido por una red polimérica entrecruzada de unidades monoméricas de *N*-vinilcaprolactama, obtenida por polimerización en medio disperso en presencia de un emulsificante catiónico o no-iónico y un iniciador catiónico, sufre un cambio volumétrico instantáneo a la temperatura de transición de fase del polímero (32-38°C), pasando del estado colapsado al estado hinchado al aumentar la temperatura, lo que le permite liberar de forma inmediata un principio activo dentro de la región de la temperatura fisiológica.

Así, en un primer aspecto la invención se relaciona con un nanogel catiónico biocompatible que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica es obtenible por polimerización en medio disperso de *N*-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

Un aspecto adicional de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende un nanogel catiónico biocompatible como se ha definido previamente, y un excipiente, vehículo o adyuvante, farmacéuticamente aceptable.

En un último aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para la obtención de un nanogel catiónico biocompatible como se ha definido anteriormente, que comprende la polimerización en medio disperso de una composición que comprende *N*-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las fotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión tomadas a aproximadamente 22°C y 60°C que ponen de manifiesto que los nanogeles de la invención se encuentran colapsados a temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase del polímero e hinchados a temperaturas por encima de dicha temperatura.

La Figura 2 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio frente a la temperatura experimentado por nanogeles constituidos por un copolímero de *N*-vinil caprolactama (VCL) y estireno (St) [a) 90% VCL/10% St; b) 70% VCL/30% St; c) 50% VCL/50% St].

La Figura 3 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio frente a la temperatura experimentado por nanogeles constituidos por un copolímero de *N*-vinil caprolactama (VCL) y metacrilato de metilo (MMA) [a) 90% VCL/10% MMA; b) 80% VCL/20% MMA; c) 70% VCL/30% MMA; d) 50% VCL/50% MMA].

La Figura 4 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio frente a la temperatura experimentado por nanogeles de la invención para distintas concentraciones de emulsificante S7A13.

La Figura 5 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio frente a la temperatura experimentado por nanogeles de la invención para distintas concentraciones de iniciador: a) 1% en peso de iniciador ADIBA (E20I1); b) 0.5% en peso de iniciador ADIBA (E20I0.5); c) 0.3% en peso de iniciador ADIBA (E20I0.3).

La Figura 6 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio frente a la temperatura experimentado por nanogeles de la invención con distintos emulsificantes: a) S7A13 (E20); b) HDTAB (H20); c) DTAB (D20); d) Tween 20 (NI20).

La Figura 7 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio frente a la temperatura experimentado por el nanogel catiónico E20 después de su liofilización y resuspensión.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un nanogel catiónico biocompatible, en adelante nanogel de la invención, que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica es obtenible por polimerización en medio disperso de *N*-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

El término “nanogel”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una partícula de hidrogel tridimensional cuyo diámetro medio es inferior a 1 μm , es decir, un diámetro comprendido entre 1 y 999 nm. Asimismo, un “hidrogel” es una red macromolecular tridimensional que se hincha en agua y que está formado a partir de un polímero entrecruzado (e.g., unidades poliméricas interconectadas entre sí mediante un agente de entrecruzamiento).

El carácter catiónico del nanogel de la invención es resultado de la utilización de un iniciador catiónico en el proceso de polimerización.

Dicho nanogel de la invención, si se desea, puede contener además, al menos, un agente biológicamente activo, dando lugar a un nanogel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo que puede ser utilizado para transportar, suministrar y/o dosificar agentes biológicamente activos al sitio de interés. Los nanogeles biocompatibles, cargados o no con agentes biológicamente activos, proporcionados por esta invención son sensibles a los cambios de temperatura del medio en el que se encuentran dispersos, y pueden hincharse y deshincharse (es decir, cambiar de tamaño), respondiendo de este modo a estímulos de temperatura.

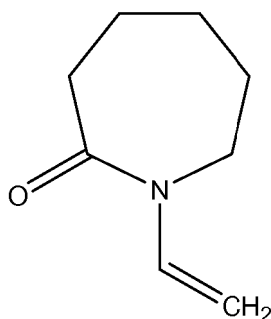
En particular, los nanogeles catiónicos biocompatibles y termosensibles de la presente invención presentan la principal ventaja frente a otros nanogeles del estado de la técnica en que, además de ser biocompatibles, experimentan un cambio volumétrico instantáneo a la temperatura de transición de fase del polímero, pasando del estado colapsado al estado hinchado al aumentar la temperatura, permitiendo así liberar de forma inmediata el principio activo dentro de la región de la temperatura fisiológica.

La figura 1 muestra las fotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión para un nanogel catiónico según la presente invención, tomadas a aproximadamente 22°C y 60°C, en las que se puede observar cómo las partículas del nanogel se encuentran hinchadas a temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase del polímero principal constitutivo de la red polimérica y colapsadas por debajo de dicha temperatura. Se demuestra además, que el aumento de tamaño del nanogel no se produce como consecuencia de la aglomeración o agregación de varias partículas sino como resultado del hinchamiento de las partículas del nanogel de forma separada.

Las nanopartículas de nanogel biocompatible cargado o no con un agente biológicamente activo proporcionadas por esta invención pueden ser liofilizadas y, posteriormente, resuspenderse en medio acuoso conservando inalteradas sus propiedades y termosensibilidad. Por tanto, los nanogeles proporcionados por esta invención son materiales biocompatibles, útiles como portadores de agentes biológicamente activos, capaces de absorber (encapsular/captar) tanto agentes biológicamente activos hidrófobos como hidrófilos, y dosificarlos apropiadamente ya que responden a estímulos de temperatura del medio en el que están dispersos.

***N*-vinilcaprolactama (VCL)**

La *N*-vinilcaprolactama (VCL) es un compuesto con la siguiente fórmula química



La VCL es un monómero anfifílico debido a que contiene grupos hidrófilos (amida) e hidrófobos (grupo vinilo y grupos alquilo del anillo de la lactama). La VCL es parcialmente soluble en agua, siendo su solubilidad de 8,5% en peso. La solubilidad en agua del correspondiente homopolímero, poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL), varía con la temperatura. La presencia de los grupos hidrófobos e hidrófilos hace que coexistan fuerzas repulsivas y atractivas. El balance de estas fuerzas determina la solubilidad del polímero.

Ciertos polímeros son solubles en agua a baja temperatura, separándose de la disolución y formando fase aparte al aumentar la temperatura por encima de un valor conocido como “temperatura inferior crítica de disolución” (en inglés, LCST), también llamada “temperatura crítica de cambio de fase”. En el caso de la PVCL, esta temperatura crítica de cambio de fase ocurre en el intervalo comprendido entre 32 y 38°C, es decir, cercano a la temperatura fisiológica.

La PVCL cuenta además con una característica adicional, su biocompatibilidad, que lo hace susceptible de ser utilizado en aplicaciones biomédicas. Durante el desarrollo de esta invención se ha observado que la síntesis de dicho polímero no se debe llevar a cabo a un pH ácido con el fin de evitar la hidrólisis de la VCL.

Los autores de la presente invención han observado que la copolimerización de VCL con otros monómeros provoca un cambio significativo en el comportamiento del polímero frente a la temperatura. Así, cuando se copolimeriza la VCL con estireno en una relación 50:50, las nanopartículas no son sensibles a la temperatura y se comportan como un látex convencional (ver Figura 2). Por su parte, la copolimerización con metacrilato de metilo (MMA) proporciona unas partículas que se comportan como los nanogeles amónicos, es decir, sufren el cambio volumétrico esperado por la PVCL, pasando del estado hinchado al colapsado al aumentar la temperatura (ver Figura 3). Esto se debe a que el metacrilato de metilo es sensible al pH y cuando el pH del medio sobrepasa el pKa del grupo carboxilo procedente de la hidrólisis del MMA, dicho grupo se ioniza aportando cargas negativas al nanogel de la invención.

La concentración de VCL respecto al total de la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para la obtención de las unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento que constituyen la red polimérica del nanogel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; en concreto, entre la concentración de VCL que al polimerizar no forme un gel macroscópico (concentración máxima) y la concentración de VCL que al polimerizar permita obtener el diámetro final deseado del nanogel biocompatible de la invención (concentración mínima). En una realización particular, la concentración de VCL está comprendida entre el 0,5-3% en peso respecto al total de la receta. En una realización aún más particular, la concentración de VCL es aproximadamente 1% en peso respecto al total de la receta.

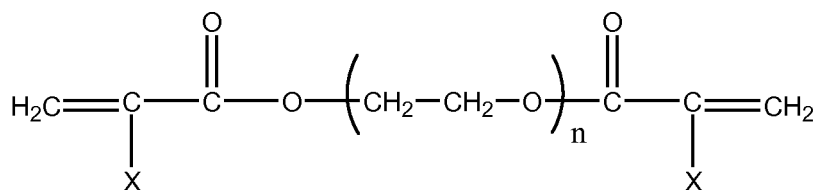
Agente de entrecruzamiento

De acuerdo con la presente invención, el componente “agente de entrecruzamiento” es un monómero difuncional que comprende al menos dos grupos vinílicos.

En una realización específica, dicho agente de entrecruzamiento es un dextrano con dos o más grupos vinílicos.

En otra realización específica, dicho agente de entrecruzamiento es *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA).

En otra realización particular, dicho agente de entrecruzamiento es un monómero difuncional que, además de dos grupos vinílicos, comprende al menos una unidad de etilenglicol. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho agente de entrecruzamiento incluyen un monómero difuncional de fórmula general



donde

X es hidrógeno o metilo, y

n es un número entero comprendido entre 1 y 90.

En una realización específica, cuando “n” es 1 y “X” es hidrógeno, el agente de entrecruzamiento es diacrilato de etilenglicol (EGDA) y cuando “n” es mayor que 1 y “X” es hidrógeno, el agente de entrecruzamiento es poli(diacrilato de etilenglicol) (PEGDA).

En otra realización específica, cuando “n” es 1 y “X” es metilo, el agente de entrecruzamiento es dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y cuando “n” es mayor que 1 y “X” es metilo, el agente de entrecruzamiento es poli(dimetacrilato de etilenglicol) (PEGDMA).

En una realización particular, el agente de entrecruzamiento es un monómero difuncional seleccionado del grupo formado por un dextrano con dos o más grupos vinilo, *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA), EGDA, PEGDA, EGDMA, PEGDMA y mezclas de los mismos.

Algunos de dichos agentes de entrecruzamiento presentan la característica de que, además de los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo, los átomos de oxígeno presentes en las unidades de etilenglicol pueden formar puentes de hidrógeno con grupos carboxilo.

La concentración de agente de entrecruzamiento, respecto a la VCL, presente en la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para la obtención de las unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de dicho agente de entrecruzamiento que constituyen la red polimérica del nanogel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, en función del diámetro deseado del nanogel biocompatible de la invención (a temperaturas más altas o bajas que la LCST); no obstante, en una realización particular, la concentración de agente de entrecruzamiento presente en dicha receta está comprendida entre 2% y 10% en peso respecto a VCL; en una realización aún más particular, la concentración de agente de entrecruzamiento presente en dicha receta es aproximadamente 8% en peso respecto a VCL.

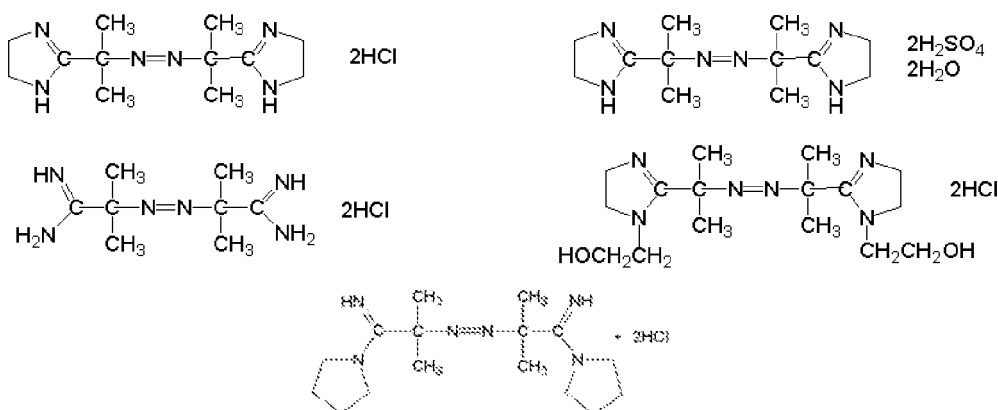
Iniciador catiónico

De acuerdo con la presente invención, el componente "iniciador catiónico" se refiere a un compuesto que por medio de activación térmica se descompone generando especies reactivas cargadas positivamente que inician el proceso de polimerización por vía radical. En consecuencia, el iniciador empleado en la invención es un iniciador térmico y catiónico.

La naturaleza catiónica del iniciador es de vital importancia en la preparación de los nanogeles, dado que es el compuesto que va a conferir la carga positiva al nanogel, siendo ésta la que permite que las nanopartículas del nanogel sufran un cambio volumétrico instantáneo en la temperatura de transición de fase y que dicho cambio suponga la transición desde el estado colapsado al estado hinchado al aumentar la temperatura.

Aunque prácticamente cualquier iniciador apropiado capaz de descomponerse y generar especies positivas podría ser utilizado, en una realización particular, dicho iniciador se selecciona del grupo formado por 2,2'-azobis (*N,N'*-dimetilen isobutiramidina)dihidrocloruro (ADIBA), 2,2'-azobis [2-(2-imidazolin-2-il)propano] disulfato dihidrato, 2,2'-azobisisobutiramidina dihidrocloruro (AIBA), 2,2'-azobis[2-[1-(2-hidroxietil)-2-imidazolin-2-il]propano] dihidrocloruro y 2,2'-azobis(1-imino-1-pirrolidino-2-etilpropano) dihidrocloruro.

Las fórmulas respectivas de estos iniciadores se muestran a continuación:



Según una realización preferida, el iniciador empleado es el 2,2'-azobis (*N,N'*-dimetilen isobutiramidina) dihidrocloruro (ADIBA), que se descompone térmicamente proporcionando especies reactivas catiónicas que permiten iniciar la polimerización y entrecruzamiento de la VCL por vía radical.

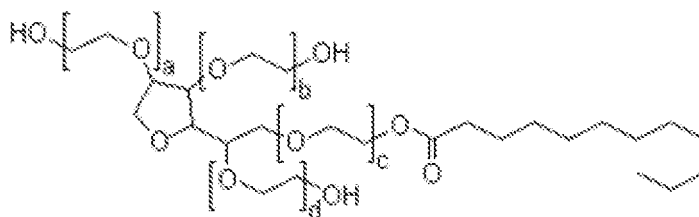
La concentración de iniciador que puede ser utilizada en la puesta en práctica de dicho procedimiento puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de iniciador está comprendida entre 0,3% y 1,5% en peso respecto a VCL; en realizaciones aún más particulares, la concentración de iniciador presente en dicha receta oscila entre 0,3 y 1,2% en peso respecto a VCL.

Emulsificante

El emulsificante confiere estabilidad coloidal a los nanogeles catiónicos de la invención. Se encuentra recubriendo la red polimérica que constituye las nanopartículas del nanogel. De acuerdo con la presente invención, el emulsificante puede ser tanto catiónico como no-iónico.

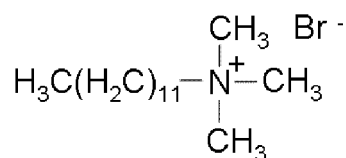
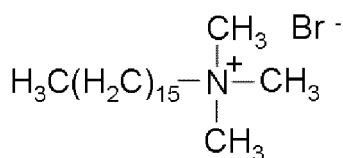
ES 2 365 315 A1

Aunque prácticamente cualquier emulsificante catiónico o no-iónico apropiado podría ser utilizado, en una realización particular, el emulsificante es un emulsificante no-iónico, preferiblemente Tween 20. La fórmula correspondiente a este compuesto se muestra a continuación:

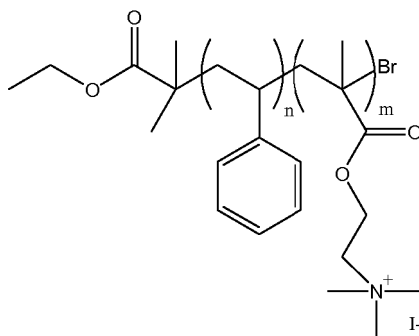


donde $a+b+c+d=20$.

En otra realización particular, dicho emulsificante es un emulsificante catiónico. Más particularmente, dicho emulsificante catiónico es un haluro de alquiltrimetilamonio. Preferentemente, el haluro de alquiltrimetilamonio se selecciona entre bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) y bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), que presentan, respectivamente, las siguientes fórmulas:



En una realización aún más preferida, el emulsificante catiónico es un copolímero de bloque amonio cuaternario, entendiéndose como tal un copolímero de bloque que presenta un grupo terminal amonio cuaternario, tal como por ejemplo un copolímero de bloque de estireno y 2-(dimetilamino) etil metacrilato de fórmula:



donde n y m son números enteros comprendidos entre 5 y 50.

De entre los compuestos que responden a esta fórmula, se prefiere el empleo del copolímero de bloque de estireno y 2-(dimetilamino) etil metacrilato definido en la fórmula anterior en el cual $n=7$ y $m=13$. Dicho compuesto se denomina a lo largo de esta memoria descriptiva como S7A13.

La síntesis de estos copolímeros de bloque se puede realizar por cualquier método conocido por un experto en la materia. No obstante, en una realización particular, la síntesis de dicho copolímero se lleva a cabo en tres etapas. Una primera etapa de polimerización de la cadena de poliestireno que se lleva a cabo en presencia de un iniciador y que es catalizada por un complejo de cobre, tal como por ejemplo $\text{CuBr}_2/\text{tris}[2-(\text{dimetilamino})\text{etil}]\text{amina}$; una segunda etapa de extensión de la cadena de poliestireno con 2-(dimetilamino) etil metacrilato (también denominado DMAEMA) que se realiza por reacción del poliestireno con DMAEMA en presencia del mencionado complejo de cobre; y una tercera etapa de cuaternización del grupo amino del metacrilato por reacción con un haluro alquílico, tal como por ejemplo yoduro de metilo. Un ejemplo detallado de la síntesis de este copolímero de bloque se detalla en el ejemplo 1, en donde $n=7$ y $m=13$.

La concentración de emulsificante que puede ser utilizada en la puesta en práctica del procedimiento de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de emulsificante está comprendida entre 0,2% y 25% en peso respecto a VCL; en una realización aún más particular, la concentración de emulsificante presente en dicha receta puede oscilar entre 0,3 y 20% en peso respecto a VCL.

Obtención del nanogel catiónico objeto de la invención

El nanogel catiónico biocompatible de la invención se obtiene como resultado del entrecruzamiento de unidades poliméricas de PVCL interconectadas entre sí a través del agente de entrecruzamiento, generando una red polimérica. Dicha red polimérica puede ser obtenida mediante un procedimiento de polimerización en medio disperso, tal como polimerización en emulsión, del monómero principal (VCL) en presencia de dicho agente de entrecruzamiento. La polimerización en emulsión de dichos monómeros además comprende en el contexto de la invención el empleo de un iniciador catiónico y de un emulsificante catiónico o no iónico. La polimerización de un monómero, así como la copolimerización de dos o más monómeros diferentes, en un medio disperso (heterogéneo) es conocida por los técnicos en la materia. En general, en este tipo de procedimiento de polimerización, el agua (e.g., agua destilada) se utiliza como medio continuo de reacción.

La reacción de polimerización puede llevarse a cabo a una temperatura comprendida dentro de un amplio intervalo; no obstante, a la hora de elegir la temperatura de reacción es muy importante tener en cuenta la temperatura crítica de cambio de fase (LCST) de las unidades poliméricas que constituyen la red polimérica del nanogel biocompatible de la invención. En una realización particular, la reacción de polimerización se lleva a cabo a una temperatura superior a las LCST de las distintas unidades poliméricas que forman parte de los nanogeles biocompatibles de la invención. En una realización concreta, la reacción de polimerización se lleva a cabo a una temperatura igual o superior a 60°C.

Asimismo, la velocidad de agitación de la formulación (receta) que contiene los componentes necesarios para generar el nanogel biocompatible de la invención mediante polimerización en un medio disperso tal como se ha mencionado previamente puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, la velocidad de agitación debe ser lo suficientemente alta como para conseguir una mezcla homogénea de la dispersión (mezcla de reacción) a la hora de sintetizar los nanogeles biocompatibles de la invención. En una realización particular, la velocidad de agitación es igual o superior a 200 rpm; en otra realización particular, la velocidad de agitación está comprendida entre 200 y 400 rpm, por ejemplo aproximadamente 300 rpm.

La reacción de polimerización puede llevarse a cabo en un reactor en modo discontinuo (o por lotes) o en modo semicontinuo.

Las características técnicas de los nanogeles biocompatibles de la invención dependerán, entre otros factores, de la naturaleza y concentración utilizadas de VCL, agente de entrecruzamiento, emulsificante, iniciador, y temperatura de reacción. Sin embargo, a modo ilustrativo, no limitativo, se pueden indicar los valores de algunas características técnicas de dichos nanogeles biocompatibles de la invención, en forma de intervalo:

- Diámetro de partícula deshinchado (15°C): 30-60 nm.
- Diámetro de partícula hinchado (55°C): 150-800 nm.
- Temperatura de transición de fase: 32.5°C-38°C.

Los nanogeles catiónicos de la invención pueden encontrarse tanto dispersos en agua como liofilizados. Una vez liofilizados, si se resuspenden en medio acuoso, mantienen sus propiedades y capacidad de hinchamiento/deshinchamiento frente a cambios de temperatura del medio de dispersión.

Nanogeles biocompatibles cargados con un agente biológicamente activo

Como se ha mencionado previamente, los nanogeles catiónicos biocompatibles de la invención son capaces de captar o encapsular agentes biológicamente activos. Por tanto, en una realización particular, el nanogel biocompatible de la invención comprende además un agente biológicamente activo. En general, dicho agente biológicamente activo puede estar en el interior del nanogel biocompatible de la invención; no obstante, en ocasiones, el agente biológicamente activo puede estar, además, unido o adsorbido a la superficie externa de dicho nanogel.

Los nanogeles catiónicos biocompatibles cargados con agentes biológicamente activos proporcionados por esta invención se encuentran en forma de nanopartículas, son sensibles a los cambios de temperatura del medio en el que se encuentran dispersos, y pueden hincharse y deshincharse (es decir, cambiar de tamaño), respondiendo de este modo a estímulos de temperatura. En particular, experimentan un cambio volumétrico instantáneo en la temperatura de fase del polímero principal constitutivo de la red polimérica, pasando de un estado colapsado a un estado hinchado al aumentar la temperatura.

Las nanopartículas de nanogel biocompatible cargado o no con un agente biológicamente activo proporcionadas por esta invención pueden ser liofilizadas y, posteriormente, resuspenderse en medio acuoso conservando inalteradas sus propiedades y sensibilidades.

5 Los nanogeles biocompatibles y sensibles a la temperatura de la presente invención presentan numerosas ventajas con respecto a otros materiales “inteligentes” que no pueden ser utilizados en la dosificación de fármacos porque no cumplen la condición de biocompatibilidad. En estos nuevos nanogeles la fuerza impulsora que controla la absorción y posterior dosificación del agente biológicamente activo tiene un cierto carácter covalente, lo que supone una ventaja adicional tanto en el transporte del agente biológicamente activo como en su dosificación en el lugar elegido.

10 Por otra parte, a diferencia de los nanogeles amónicos de PVCL, los nanogeles catiónicos de la invención permiten liberar el ingrediente activo de forma inmediata debido al cambio volumétrico instantáneo experimentado.

15 El término “agente biológicamente activo”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia que se administra a un sujeto, preferentemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia que puede ser utilizada en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales, por ejemplo, fármacos, antígenos, alérgenos, etc.

20 El nanogel biocompatible de la invención o las nanopartículas de nanogel biocompatible de la invención pueden incorporar uno o más agentes biológicamente activos independientemente de las características de solubilidad de las mismas.

25 La naturaleza química del agente biológicamente activo puede variar dentro de un amplio intervalo, desde moléculas pequeñas hasta compuestos macromoleculares (péptidos, polinucleótidos, etc.). En una realización particular, dicho agente biológicamente activo es un péptido o una proteína. En otra realización particular, dicho agente biológicamente activo es un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido o un ácido nucleico (e.g., ARN o ADN). En otra realización particular, dicho agente biológicamente activo es una molécula (orgánica o inorgánica) pequeña; generalmente, estas moléculas se obtienen por métodos de síntesis química o semisintéticos o, alternativamente, se aíslan de sus fuentes. En una realización concreta, dicha molécula (orgánica o inorgánica) pequeña, tiene un peso molecular relativamente bajo, generalmente, igual o inferior a 5.000, típicamente, igual o inferior a 2.500, ventajosamente, igual o inferior a 1.500. Numerosos principios activos terapéuticos (fármacos) contienen estas características y, por tanto, pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención.

35 Los nanogeles biocompatibles de la invención (y, consecuentemente, las nanopartículas de nanogeles biocompatibles de la invención) pueden ser utilizados como vehículos para la administración tanto de sustancias hidrófilas como de sustancias hidrófobas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes biológicamente activos (definidos por grupos terapéuticos) que pueden ser utilizados y encapsulados en el interior de dichos nanogeles y nanopartículas incluyen: sustancias anticancerígenas, antibióticos, inmunodepresivos, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias contra el Parkinson, antiespasmódicos y contractores musculares, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparásitos y/o antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, anestésicos locales, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos, neurotransmisores, proteínas, modificadores de la respuesta celular y vacunas.

45 Por tanto, los nanogeles proporcionados por esta invención son materiales biocompatibles, útiles como portadores de agentes biológicamente activos, capaces de absorber (encapsular/captar) tanto agentes biológicamente activos hidrófobos como hidrófilos, y dosificarlos apropiadamente ya que responden a estímulos de temperatura del medio en el que están dispersos.

50 La captación o encapsulación del agente biológicamente activo por los nanogeles biocompatibles de la invención puede llevarse a cabo por métodos convencionales. En una realización particular, la reacción de polimerización en medio disperso para producir el nanogel biocompatible de la invención puede llevarse a cabo en presencia del agente biológicamente activo con el fin de encapsular dicho agente en su interior. Alternativamente, el procedimiento de obtención del nanogel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo proporcionado por esta invención comprende poner en contacto una dispersión que comprende un nanogel biocompatible de la invención con una disolución que comprende dicho agente (o agentes) biológicamente activo(s) a encapsular.

60 De forma más concreta, en una realización particular, se mezcla una dispersión que comprende los nanogeles biocompatibles de la invención (o nanopartículas a base de dichos nanogeles) con una disolución del agente biológicamente activo a captar, a un pH determinado; la disolución resultante se agita durante un periodo de tiempo apropiado y se separan los nanogeles de la invención cargadas con el agente biológicamente activo por métodos convencionales, tales como centrifugación (e.g., a 10.000-15.000 rpm y 20°C). Después de separar los nanogeles cargados se analiza el sobrenadante por métodos convencionales, e.g., mediante espectrofotometría. Conocida la concentración de agente biológicamente activo que se ha utilizado y la concentración de agente biológicamente activo que ha quedado en el sobrenadante, se puede calcular la cantidad de agente biológicamente activo captado o absorbido.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un nanogel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo proporcionado por esta invención, y un excipiente, vehículo o adyuvante, farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición (sólida o semisólida) destinada a su administración oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, intranasal, pulmonar, rectal, vaginal, parenteral, tópica, etc. En una realización particular, la composición farmacéutica se administra por vía oral debido a su biocompatibilidad. Los nanogeles biocompatibles de la invención son unos materiales “inteligentes” que proporcionan una liberación más controlada del agente biológicamente activo y protegen a dichos agentes biológicamente activos durante la liberación pudiendo controlarse de este modo su biodisponibilidad de manera uniforme y constante. La reversibilidad en las propiedades de hinchamiento de estos nanogeles convierte a estos materiales en excelentes vehículos de transporte tanto de agentes biológicamente activos de pequeño tamaño como de nuevos fármacos macromoleculares (por ejemplo, péptidos) y otros productos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas descritas comprenderán los excipientes adecuados para cada formulación. Por ejemplo, en el caso de formulaciones orales en forma de comprimidos o cápsulas se incluirán si es necesario agentes aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes de carga, recubrimiento entérico, etc. Las formulaciones sólidas orales se preparan de forma convencional por mezclado, granulación en seco o húmedo e incorporando el nanogel biocompatible de la invención cargado con el agente biológicamente activo. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La proporción del agente biológicamente activo incorporada en los nanogeles biocompatibles de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 50% en peso respecto al peso total de las nanopartículas. No obstante, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la moléculas biológicamente activa incorporada.

La invención se describe a continuación mediante unos ejemplos que nos son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

Ejemplos40 *Materiales*

El monómero principal: *N*-vinilcaprolactama (VCL, Aldrich); el iniciador catiónico: 2,2'-azobis (*N,N'*-dimetilen isobutiramidina) dihidrocloruro (ADIBA, Wako Chemical GmbH); el agente de entrecruzamiento: diacrilato de poli(etilen glicol) (PEGDA 200, Polyscience) y los emulsificantes: bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) y Tween 20, fueron adquiridos comercialmente.

El emulsificante catiónico S7A13 (copolímero de bloque con 7 unidades de estireno y 13 de DMAEMA) se preparó de acuerdo al procedimiento mostrado en el siguiente ejemplo.

50 **Ejemplo 1**

Síntesis de S7A13: copolímero de bloque anfifílico de poliestireno (PSty) y 2-(dimetilamino)etil metacrilato (PDMAEMA)

55 *Materiales*

En esta síntesis vía ARGET ATRP se utilizaron los siguientes materiales:

- 60 - Estireno (Aldrich), que fue purificado mediante destilación (5 mbar a 25°C);
- Metacrilato de dimetiletilamina (Aldrich), que fue purificado asimismo mediante destilación (2 mbar a 25°C);
- 65 - Bromuro de cobre (II) (CuBr₂) (Aldrich), que se utilizó tal como fue adquirido (99-100% de pureza).
- Etil-2-bromoisobutirato (EBiB) (Aldrich), que fue purificado mediante destilación (3 mbar a 30°C); y

- tris[2-(dimetilamino)etil]amina (Me₆TREN), que fue preparado según se describe en *Macromolecules*, **1998**, 31, 5958 o en *Inorg. Chem.*, **1966**, 5, 41.

Síntesis del macroiniciador PSty

El macroiniciador PSty fue preparado utilizando etil 2-bromoisobutirato (EBiB) como iniciador. La reacción fue catalizada por el complejo CuBr₂/tris[2-(dimetilamino)etil]amina (Me₆TREN) bajo argón. El anisol fue utilizado como disolvente y se adicionó ácido ascórbico en exceso como agente reductor para reducir el Cu(II) a Cu(I). Los distintos componentes empleados en la síntesis del macroiniciador PSty así como las cantidades de cada uno de ellos se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Componentes para la síntesis del macroiniciador PSty-Br

	g	equivalentes	mol
Estireno	59	9,57	0,57
EBiB (98%)	11	1	0,06
CuBr ₂	0,13	0,009	0,000567
tris[2-(dimetilamino)etil]amina (Me ₆ TREN)	1,3	0,076	0,004547
Ácido ascórbico	1	10,2	0,005763
Anisol	43	35	0,40

El ligando (Me₆TREN) y el CuBr₂ se mezclaron en un tubo “schlenk” con 5 gramos de anisol para formar el complejo CuBr₂/tris[2-(dimetilamino)etil]amina. Se borboteó argón a través de la disolución del complejo durante 15 minutos mientras se agitaba. El ácido ascórbico se disolvió en el resto del anisol y se adicionó a un matraz de tres bocas de 250 mL. El estireno y la disolución con el complejo se transfirieron al matraz. Se efectuaron 3 ciclos de enfriamiento sobre la mezcla de reacción y se mantuvo bajo atmósfera de argón durante toda la reacción. La temperatura del baño de aceite se fijó en 90°C y cuando la temperatura de la mezcla de reacción fue de 90°C, se adicionó el iniciador EBiB con el fin de comenzar la polimerización. La reacción procedió durante 32 horas. Se tomaron alícuotas de 1 mL durante la reacción. Los pesos moleculares se midieron mediante cromatografía de exclusión de gel (SEC). La conversión fue seguida mediante cromatografía de gases utilizando el disolvente de reacción como patrón interno. El producto final se purificó mediante precipitación en metanol. El polímero obtenido se secó a vacío en un horno a 40°C durante 24 horas. El producto se caracterizó mediante SEC y MALDI-TOF y ¹H NMR.

La polimerización se controló de forma adecuada, proporcionando polímeros con pesos moleculares controlados y bajas polidispersidades. La conversión final fue del 80%. Según el análisis por SEC, el peso molecular promedio en número (M_n) fue de 878 g/mol con una polidispersidad de 1,2. Los análisis mediante MALDI-TOF confirmaron estos resultados. El contenido máximo teórico de cobre en el polímero antes de la purificación fue de aproximadamente 600 ppm. Este contenido es muy bajo si se compara con los valores para ATRP normal en donde este contenido es de en torno a 40.000 ppm.

Extensión de la cadena del macroiniciador PSty-Br con DMAEMA

La cadena del macroiniciador (PSty-Br) fue extendida con DMAEMA con el fin de proporcionar un copolímero de bloque. El macroiniciador (PSty-Br), DMAEMA y 95% en peso de anisol se adicionaron en un matraz de tres bocas. Se aplicaron 3 ciclos de enfriamiento a la mezcla de reacción y se mantuvo bajo atmósfera de argón durante toda la reacción. La mezcla de reacción se calentó a 25°C. Por otra parte, se desgasificó una mezcla del complejo CuBr₂/tris[2-(dimetilamino)etil]amina (Me₆TREN) y 5% de anisol con argón durante 15 minutos y se adicionó a la mezcla de reacción anterior. Los componentes empleados para la reacción de extensión de cadena de PSty-Br con DMAEMA, así como sus correspondientes cantidades se muestran en la Tabla 2. La reacción procedió durante 24 horas. El producto final se recrystalizó en n-heptano para eliminar el PSty-Br que no había reaccionado. Incluso cuando el producto final contenía cantidades muy pequeñas de cobre, el copolímero de bloque fue extra purificado mediante disolución de

ES 2 365 315 A1

50 g del polímero obtenido en 1 L de agua acidificada con 10 mL de HCl_{aq} (33%). Posteriormente, se neutralizó la solución mediante la adición de 20 g de una solución de NaOH en agua al 25%. Se recuperó el copolímero de bloque precipitado y posteriormente se secó en un horno a vacío a 40°C durante 24 horas. La composición del copolímero de bloque se determinó mediante ¹H NMR.

TABLA 2

Componentes para la extensión del macroniciador PSty-Br con DMAEMA

	g	equivalentes	mol
DMAEMA	76	8,54	0,43
Psty-Br (M _n =878 g/Mol)	43	1	0,050
CuBr ₂	0,11	0,010	0,0005
tris[2-(dimetilamino)etil]amina (Me ₆ TREN)	1,14	0,100	0,005
Ácido ascórbico	0,87	9,9	0,005
Anisol	189	35	1,75

La reacción de extensión de cadena mostró un comportamiento lineal cuando Mn se representó frente a la conversión, lo que demuestra que la reacción procede bajo un mecanismo controlado. La conversión final fue de 90% después de 24 horas. Se recuperó entre un 10 y un 20% de la cantidad total del macroiniciador PSty inicialmente incorporado tras el término de la reacción, mostrando que una fracción significativa del macroiniciador no puede extenderse. La composición final del copolímero de bloque según el espectro de ¹H NMR fue de 13 unidades de DMAEMA y 7 unidades de estireno. Tras la purificación final, se comprobó por espectroscopia atómica que el contenido total de cobre era prácticamente despreciable.

Cuaternización de PSty₇-b-PDMAEMA₁₃

El copolímero de bloque se disolvió en 4,5 veces su peso en THF y se adicionó CH₃I en doble exceso molar. La reacción procedió durante 24 horas a temperatura ambiente. Se recuperó el poliestireno-b-poli(trimetil amonio etil metacrilato) (PSty-b-PTMAEMA) a partir de la mezcla tras completar la reacción, mediante la eliminación del THF y posterior lavado del polímero con dietileter. El exceso utilizado de CH₃I garantizó que la cantidad total de los grupos de DMAEMA estuviera totalmente cuaternizada. Se realizaron análisis por ¹H NMR utilizando D₂O como disolvente para demostrar que todos los grupos amino estaban cuaternizados.

Ejemplo 2

Síntesis de nanogeles catiónicos estabilizados con S7A13

Estos nanogeles se sintetizaron en un reactor por lotes (discontinuo) mediante copolimerización en emulsión. VCL se usó como monómero principal, PEGDA como agente de entrecruzamiento, S7A13 como emulsificante y ADIBA como iniciador.

Las partículas de nanogel se prepararon usando diferentes concentraciones de emulsificante e iniciador. Las Tablas 3 y 4 muestran las recetas y condiciones de reacción usadas en la producción de estos nanogeles variando la concentración de emulsificante e iniciador, respectivamente.

ES 2 365 315 A1

TABLA 3

Variación de concentración de S7A13

Reactivos	E2.5	E5	E10	E15	E20
PEGDA (p/p% M)	8	8	8	8	8
S7A13 (p/p% M)	2,5	5	10	15	20
ADIBA (p/p% M)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
* Condiciones de reacción: rpm= 300; tiempo de reacción= 5h; T= 70°C; * [VCL]=1 p/p %					

TABLA 4

Variación de concentración de ADIBA

Reactivos	E20I1.0	E20I0.5	E20I0.3
PEGDA (p/p%)	8	8	8
S7A13 (p/p%)	20	20	20
ADIBA (p/p%)	1,2	0,6	0,36
* Condiciones de reacción: rpm= 300; tiempo de reacción=5h; T= 70°C; * [VCL]=1 p/p %.			

Ejemplo 3

Síntesis de nanogeles catiónicos estabilizados con diferente tipo de emulsificante (S7A13. HDTAB. DTAB. o Tween 20)

Estos nanogeles se sintetizaron en un reactor por lotes o discontinuo mediante copolimerización en emulsión. VCL se usó como monómero principal, PEGDA como agente de entrecruzamiento y ADIBA como iniciador. Las partículas de nanogel se prepararon usando distintos emulsificantes: S7A13, HDTAB, DTAB, o Tween 20.

La Tabla 5 muestra las recetas y condiciones de reacción usadas en la producción de estos nanogeles.

TABLA 5

Reactivos	E20	H20	D20	NI20
PEGDA (p/p% M)	8	8	8	8
S7A13 (mol% M)	0,3	-	-	-
HDTAB (mol% M)	-	0,3	-	-
DTAB (mol% M)	-	-	0,3	-
Tween 20 (mol% M)	-	-	-	0,3
ADIBA (p/p% M)	1,2	1,2	1,2	1,2
* Condiciones de reacción: rpm= 300; tiempo de reacción=5h; T= 70°C;				
*[VCL]=1 p/p %				

Ejemplo 4

Efecto de la temperatura del medio en el diámetro hidrodinámico promedio del nanogel

La Figura 1 muestra la respuesta de los nanogeles catiónicos, sintetizados con distinta concentración de S7A13, a los cambios de temperatura del medio de dispersión. Como se puede observar, los nanogeles están colapsados cuando la temperatura del medio se encuentra entre 10-30°C. A continuación se produce un cambio o salto instantáneo de tamaño (diámetro hidrodinámico promedio) que coincide con la temperatura de transición de fase del homopolímero polivinilcaprolactama (PVCL) que se obtendría al polimerizar en solitario el monómero vinílico (VCL) utilizado en la síntesis como monómero principal. A bajas temperaturas, los tamaños no varían con la concentración de emulsificante. Sin embargo, cuando la temperatura del medio está por encima de la temperatura de transición se observan diferencias: cuanto mayor es la concentración de emulsificante mayor es el tamaño del nanogel.

A continuación, en la Figura 2 se muestra la respuesta de los nanogeles catiónicos, sintetizados variando la concentración de iniciador, a los cambios de temperatura del medio. Se puede apreciar que la disminución de la concentración de iniciador hace que disminuya el tamaño de los nanogeles a altas temperaturas. Además, el comportamiento del nanogel es reversible y el salto ocurre tanto al calentar como al enfriar el medio en el que está disperso el nanogel.

En cuanto al efecto del tipo de emulsificante, la Figura 3 muestra que los nanogeles sintetizados con emulsificante tanto catiónico (HDTAB o DTAB) como no iónico (Tween 20) presentan el mismo comportamiento que el nanogel E20 en el que se ha utilizado el copolímero de bloque anfifílico S7A13. Hay que tener en cuenta que aunque en la síntesis del nanogel NEO no se ha utilizado emulsificante catiónico, también es un nanogel catiónico debido a la carga positiva proveniente del iniciador (ADIBA).

Comparando los diámetros obtenidos con los del nanogel E20, tomado como referencia, se observa que existen diferencias tanto a bajas como a altas temperaturas. Los nanogeles sintetizados utilizando HDTAB o DTAB presentan el mayor diámetro colapsado (110 nm). El nanogel NI20 presenta un tamaño de 90 nm en estado colapsado, mientras que el nanogel E20 tiene el tamaño más pequeño, 50 nm.

En cuanto al salto en la transición, éste decrece cuando se usa HDTAB o DTAB como emulsificante, obteniéndose tamaños hinchados inferiores a los de los nanogeles E20 y NI20. De esta manera queda patente la mejora que la utilización del copolímero de bloque anfifílico S7A13 en la receta supone en el salto instantáneo del estado colapsado al hinchado experimentado por las partículas de nanogel al aumentar la temperatura por encima del valor de la transición de fase de la PVCL.

Sigue observándose que el comportamiento del nanogel es reversible ya que el salto instantáneo de estado colapsado a hinchado ocurre tanto al calentar como al enfriar el medio en el que está disperso el nanogel.

Ejemplo 5

Liofilización-redispersión

- 5 En la figura 4 se muestra el comportamiento del nanogel catiónico de referencia (E20) en dispersión (no liofilizado) y después de su liofilización y posterior redispersión (tiempo de resuspensión en minutos). El comportamiento del nanogel liofilizado y posteriormente resuspendido en agua es el mismo que el del nanogel no liofilizado, es decir, se encuentra colapsado a bajas temperaturas e hinchado a altas. Se observa que el salto instantáneo se produce a la misma temperatura y que los tamaños colapsados a bajas temperaturas (10-30°C) se mantienen idénticos, mientras que los correspondientes al estado hinchado a altas temperaturas se ven afectados por la liofilización, siendo menores que los del nanogel que no ha sido liofilizado.
- 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un nanogel catiónico biocompatible que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica es obtenible por polimerización en medio disperso de *N*-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

2. Nanogel según reivindicación 1, en la que dicho agente de entrecruzamiento es un monómero difuncional que comprende al menos dos grupos vinílicos.

3. Nanogel según reivindicación 2, donde el agente de entrecruzamiento se selecciona entre dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), polidietilenglicol dimetacrilato (PEGDMA), diacrilato de etilenglicol (EGDA), polidietilenglicol diacrilato (PEGDA), etilenglicol di(1-metacrililoiloxi)etil éter, *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA), un dextrano con más de un grupo vinilo, y sus mezclas.

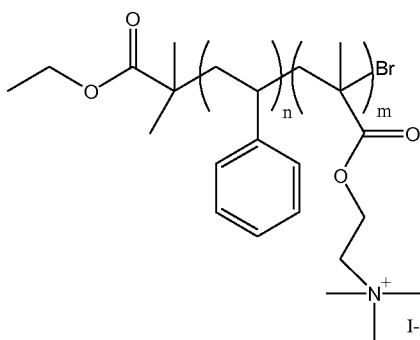
4. Nanogel según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el iniciador catiónico se selecciona entre el grupo formado por 2,2'-azobis (*N,N'*-dimetilen isobutiramidina) dihidrocloruro (ADIBA), 2,2'-azobis [2-(2-imidazolin-2-il)propano] disulfato dihidrato, 2,2'-azobisisobutiramidina dihidrocloruro (AIBA), 2,2'-azobis{2-[1-(2-hidroxi)etil]-2-imidazolin-2-il]propano} dihidrocloruro y 2,2'-azobis(1-imino-1-pirrolidino-2-etilpropano) dihidrocloruro.

5. Nanogel según reivindicación 4, en el que el iniciador catiónico es 2,2'-azobis (*N,N'*-dimetilen isobutiramidina) dihidrocloruro (ADIBA).

6. Nanogel según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el emulsificante es catiónico.

7. Nanogel según reivindicación 6, en el que el emulsificante catiónico se selecciona entre bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio y un copolímero de bloque amonio cuaternario.

8. Nanogel según reivindicación 7, en el que el copolímero de bloque amonio cuaternario es un copolímero de bloque de estireno y 2-(dimetilamino)etil metacrilato de fórmula:



donde *n* y *m* son números enteros comprendidos entre 5 y 50.

9. Nanogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además, un agente biológicamente activo.

10. Nanogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en forma de nanopartículas.

11. Nanogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en forma liofilizada.

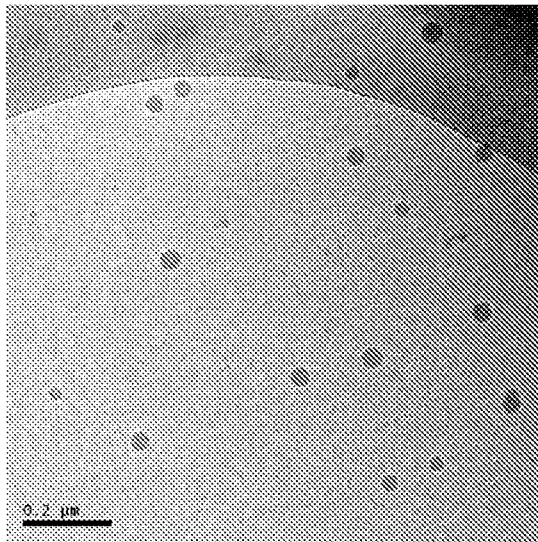
12. Una composición farmacéutica que comprende un nanogel catiónico biocompatible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y un excipiente, vehículo o adyuvante, farmacéuticamente aceptable.

13. Un procedimiento para la obtención de un nanogel catiónico biocompatible según la reivindicación 1, que comprende la polimerización en medio disperso de una composición que comprende *N*-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

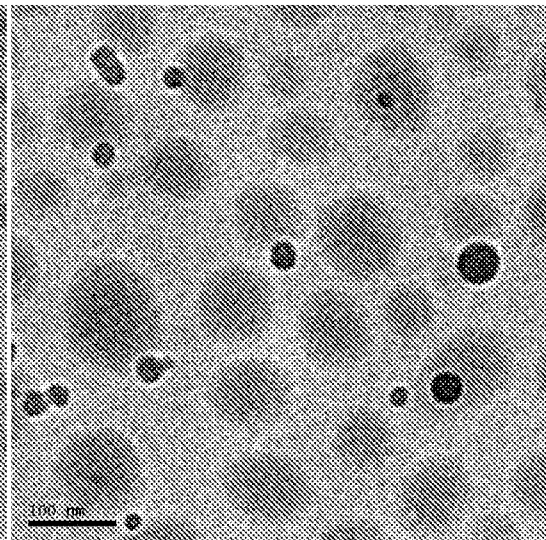
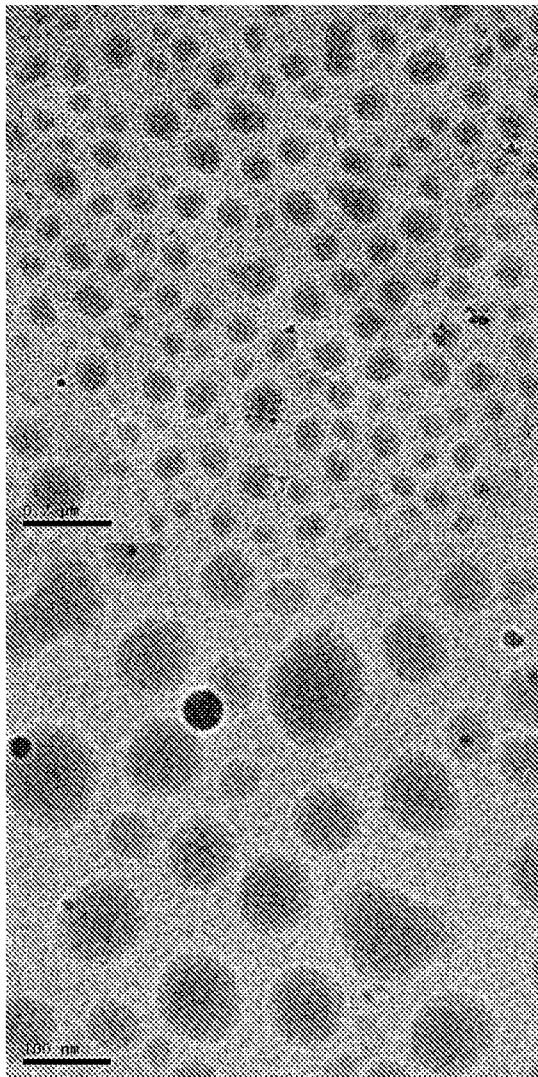
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha polimerización se lleva a cabo en presencia de un agente biológicamente activo.

15. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende, además, poner en contacto dicho nanogel biocompatible con una disolución que comprende un agente biológicamente activo.

ES 2 365 315 A1



T=22°C



T= 60°C

Figura 1

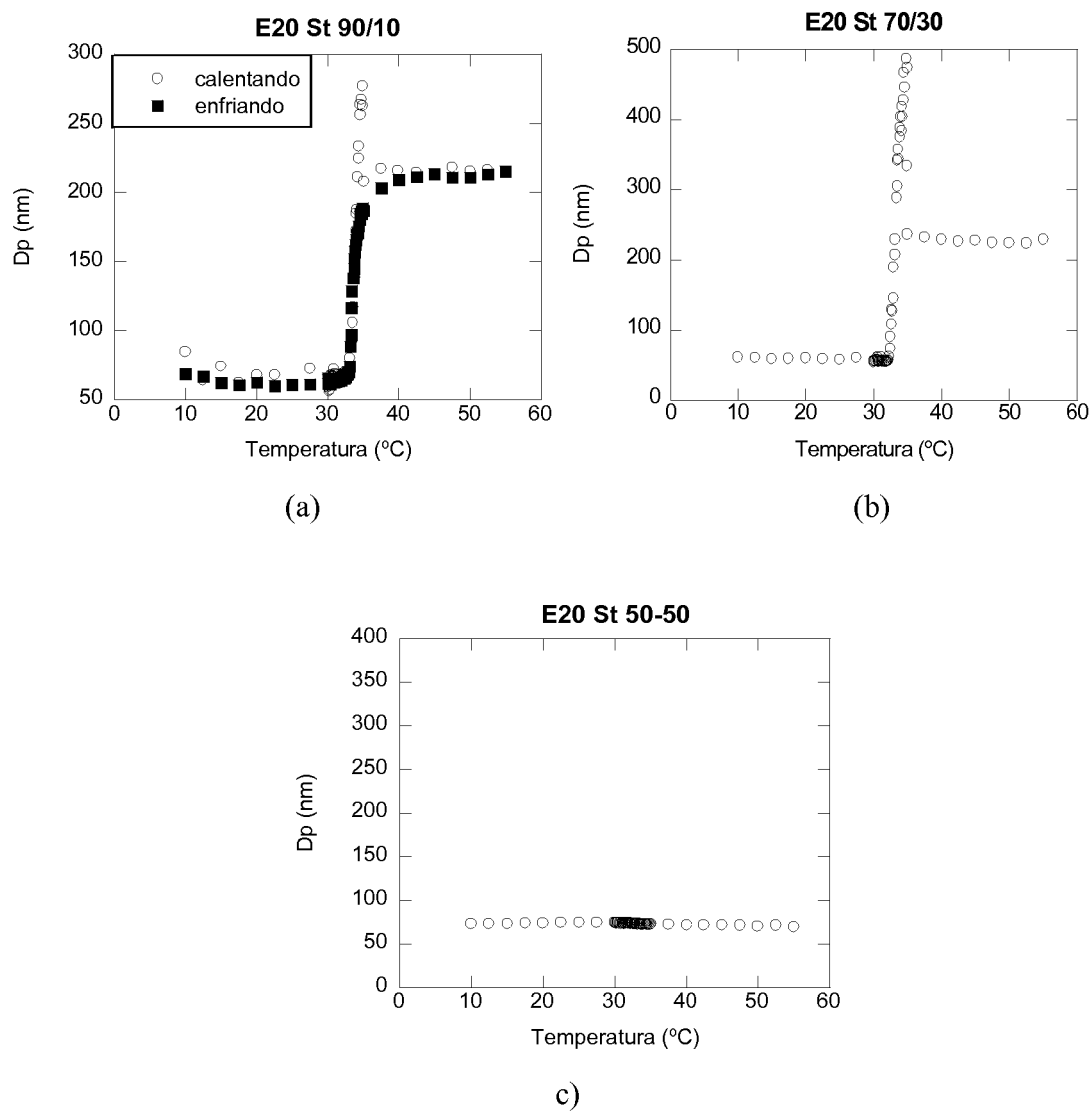


Figura 2

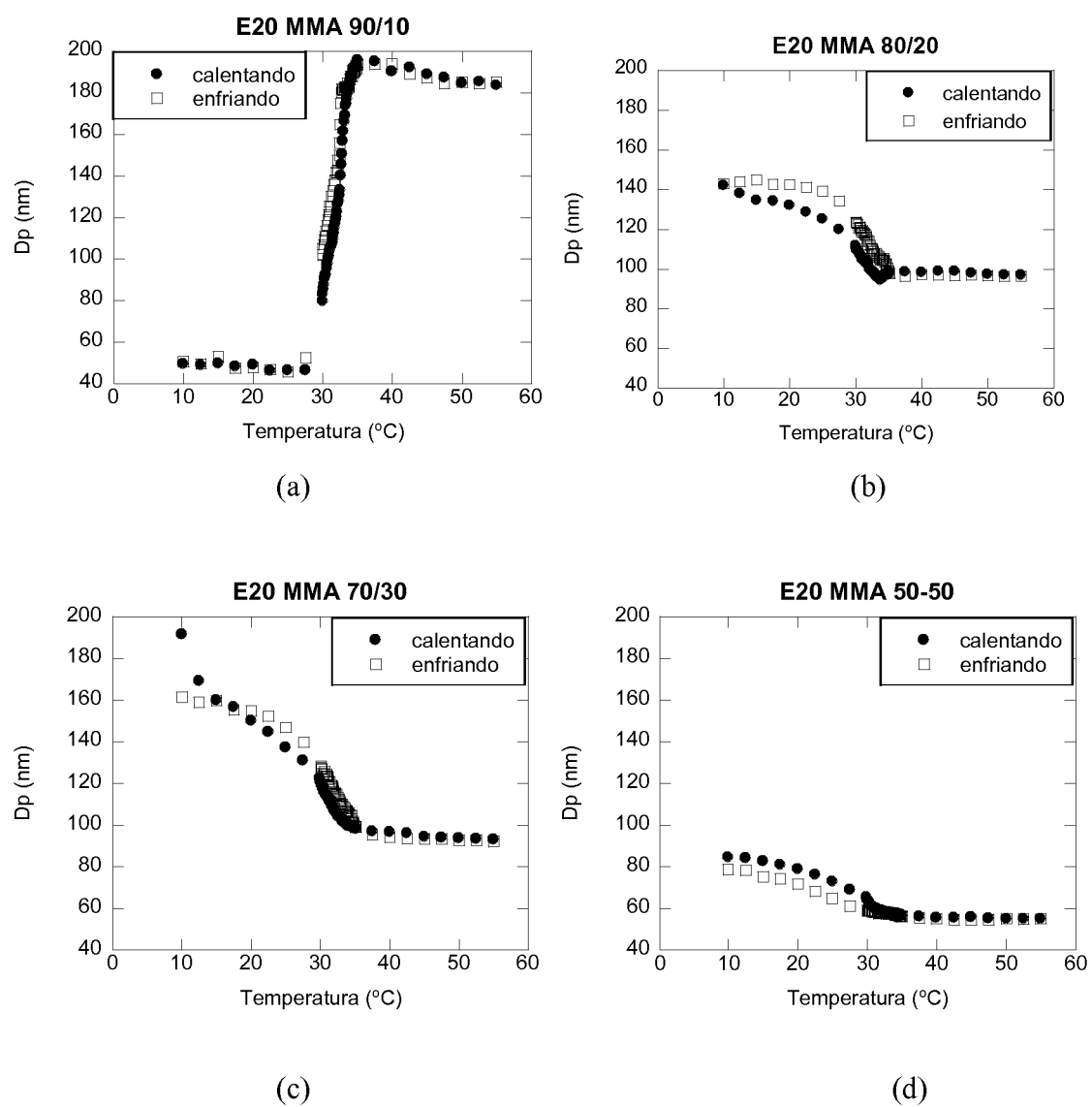


Figura 3

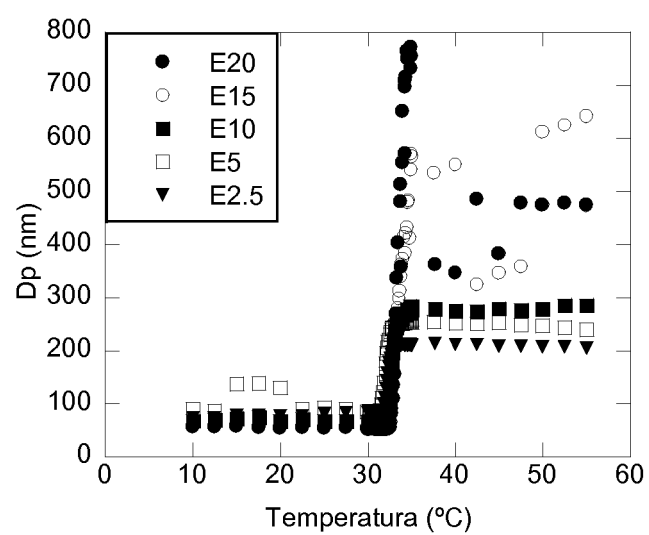


Figura 4

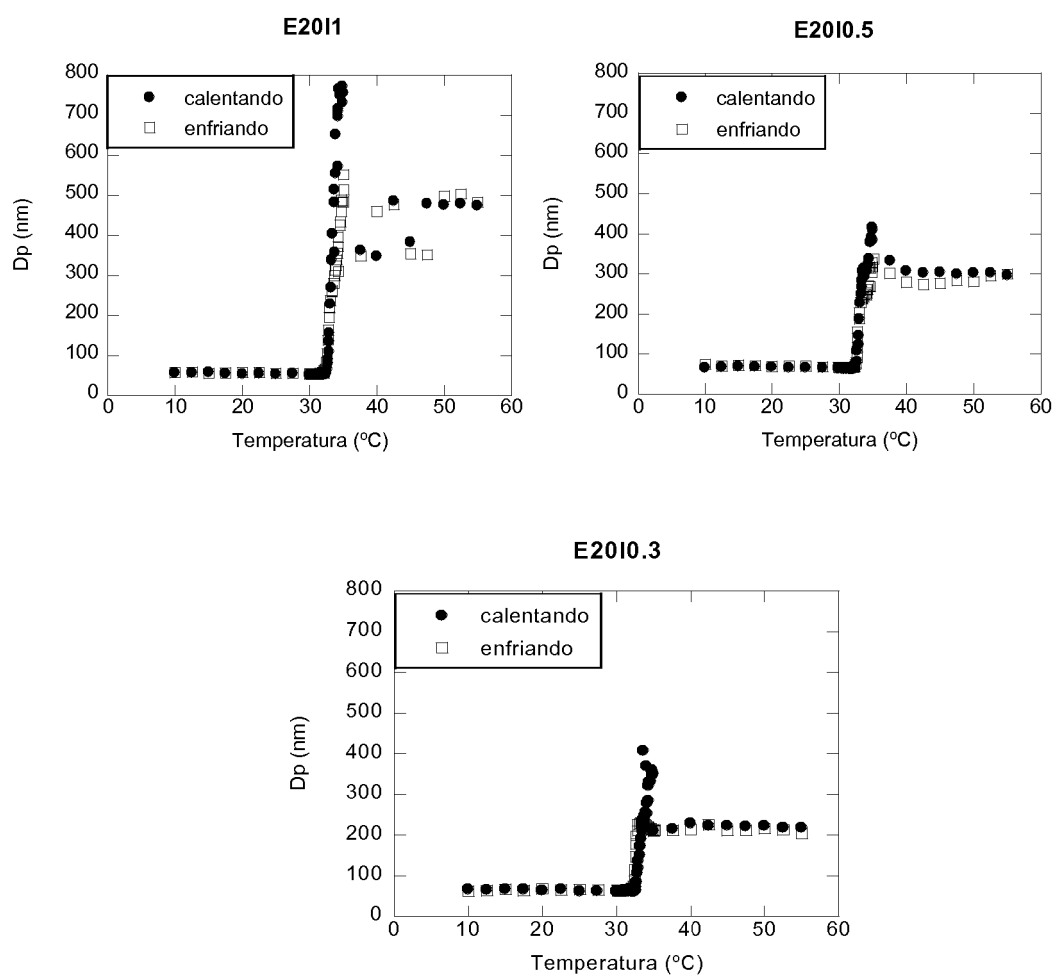


Figura 5

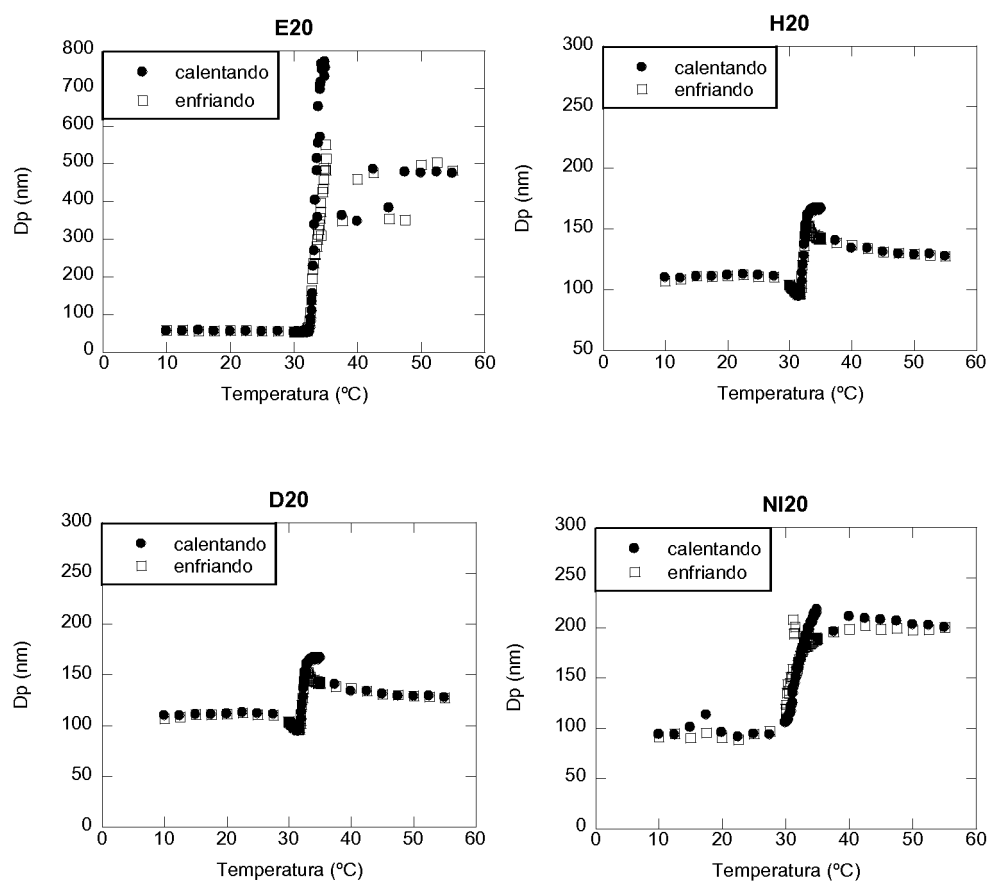


Figura 6

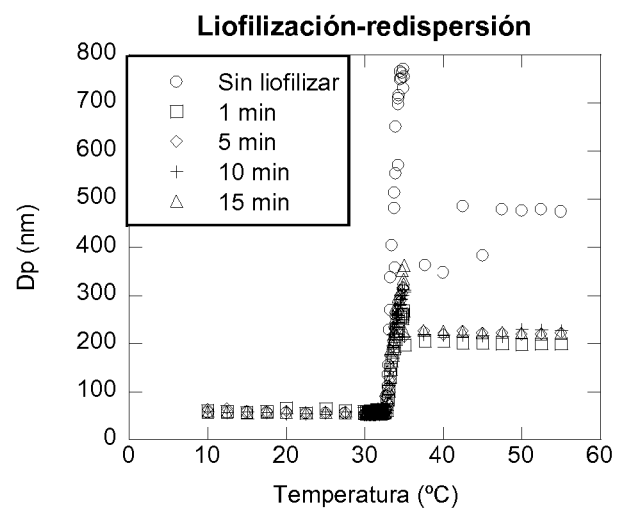


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030399

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C08F26/06** (2006.01)
A61K47/32 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2319042 A1 (UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO) 01.05.2009, página 3, línea 30 – página 9, línea 21; ejemplos.	1-15
A	PICH, ANDRIJ et al.; Biocompatible hybrid nanogels; Small (2008), volumen 4, número 12, páginas 2171-2175; ISSN 1613-6810.	1-15
A	WO 2008155282 A2 (RHODIA OPERATIONS) 24.12.2008, página 2, líneas 1-12; página 6, líneas 1-8; página 8, líneas 5-23; página 10, línea 18 – página 11, línea 27; página 15, líneas 13-36; página 18, líneas 7-9.	1-15

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
27.06.2011

Examinador
N. Vera Gutiérrez

Página
1/4

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

C08F, 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, REGISTRY, CAS, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2319042 A1	01.05.2009
D02	PICH, ANDRIJ et al.; Small (2008), 4 (12), 2171-2175	2008
D03	WO 2008155282 A2	24.12.2008

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 nanogel catiónico biocompatible que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica es obtenible por polimerización en medio disperso de N-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

El documento D01 divulga microgeles biocompatibles que comprenden unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en los que dicha red polimérica es obtenible por polimerización en medio disperso de un monómero vinílico y un co-monómero basado en un carbohidrato. En el procedimiento de preparación se añade un emulsificante aniónico (dodecil sulfato de sodio) y un iniciador (persulfato potásico) (página 6, líneas 45-63). Como agente de entrecruzamiento se utiliza un monómero difuncional que comprende al menos una unidad de etilenglicol y al menos un grupo vinilo, por ejemplo: dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), poli(dimetacrilato de etilenglicol) (PEGDMA), diacrilato de etilenglicol (EGDA) y poli(diacrilato de etilenglicol) (PEGDA) (página 5, líneas 65-67). Las partículas de hidrogel presentan un diámetro entre 10 y 1000 nm y se encuentran en forma de nanopartículas que pueden ser liofilizadas para poder ser utilizadas en el transporte y dosificación de agentes biológicamente activos (página 3, líneas 37-53).

En el documento D02 se describen nanogeles híbridos biocompatibles que incorporan nanopartículas de lantánidos. Para su preparación, se añaden las nanopartículas a una mezcla de reacción que comprende N-vinilcaprolactama (VCL) y acetoacetoxietil metacrilato (AAEM) como monómeros, 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AMPA) como iniciador y metilenbisacrilamida como agente de entrecruzamiento.

El documento D03 divulga un microgel polimérico reticulado que puede ser utilizado como portador de principios activos, para la liberación controlada de los mismos (página 18, líneas 7-11). Estos microgeles están constituidos por moléculas reticuladas que pueden tener un tamaño entre 5 y 100 nm (página 6, líneas 2-3). En los ejemplos se preparan microgeles que comprenden 2, 2'-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro como iniciador catiónico, N,N'-metilenbisacrilamida (BA) como agente de entrecruzamiento, cloruro de (3-acrilamidopropil) trimetilamonio (APTAC) como monómero catiónico y acrilamida (AM) como monómero hidrófilo neutro. Entre los monómeros hidrófilos neutros que pueden ser empleados se encuentra la N-vinilcaprolactama (página 8, línea 23).

Ninguno de los documentos citados divulga un nanogel catiónico con las características detalladas en la reivindicación 1 de la solicitud, que sea obtenido por polimerización en medio disperso de N-vinilcaprolactama y un agente de entrecruzamiento, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsificante catiónico o no-iónico.

Por ello, se considera que las reivindicaciones 1-15 de la solicitud son nuevas y poseen actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).