

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 244**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 8/11 (2006.01)

B01J 13/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06380048 .6**

96 Fecha de presentación: **13.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1834635**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **SISTEMAS ESTABLES DE NANOCÁPSULAS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE MOLÉCULAS ACTIVAS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2011

73 Titular/es:
**Advancell Advanced in Vitro Cell
Technologies,S.A.
Barcelona Science Park C/ Baldiri Reixac, 10 - 1ª
planta
08028 Barcelona**

72 Inventor/es:
**Vila Pena, Ana Isabel;
Suárez Luque, Silvia y
Alonso Fernández, M. Jose**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 369 244 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

Sistemas estables de nanocápsulas para la administración de moléculas activas

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se dirige a sistemas nanocapsulares caracterizados por presentar una elevada estabilidad durante largos periodos de tiempo. Estos sistemas son útiles para la liberación controlada de moléculas farmacológicamente o cosmetológicamente activas, especialmente de naturaleza fuertemente lipofílica. En concreto se dirige a sistemas que comprenden nanocápsulas dispersas en una fase acuosa, a composiciones cosméticas y farmacéuticas que los comprenden, así como a procedimientos para su obtención.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 Los sistemas para la liberación de agentes biológicamente activos constituyen un campo de investigación en continuo desarrollo. Es ampliamente conocido en el campo de la galénica que la administración de principios activos, especialmente los de carácter fuertemente lipofílico, por vía tópica (transdérmica o a través de la mucosa) es particularmente inadecuada, debido a que su alta lipofilia provoca que la penetración a través de la barrera lipídica epidérmica sea prácticamente imposible.
- 15 Por este motivo, se han ido desarrollando en las dos últimas décadas diferentes sistemas para la liberación de este tipo de moléculas que permiten aumentar la biodisponibilidad y la absorción de estos fármacos a través del epitelio tras su aplicación. De entre estos sistemas destaca fundamentalmente la elaboración de suspensiones coloidales, tales como liposomas, microemulsiones, nanoesferas y nanopartículas, basadas en la formación de una fase oleosa en la cual se incorpora el ingrediente activo, dispersa en una fase acuosa, gracias a la utilización de uno o varios agentes tensoactivos.
- 20 Así, Prego et al. [*J. Control. Release*, 111 (2006) 299-308] divulga una suspensión coloidal acuosa de nanocápsulas con un núcleo lipofílico hecho de lecitina y un aceite que comprende ácidos grasos de cadena C₈-C₁₀ (por ejemplo Miglyol 812), y un recubrimiento hidrofílico que comprende quitosano-PEG y Poloxámero 188.
- 25 La solicitud EP1243323 divulga nanocápsulas con un núcleo de matriz lipofílica que comprende fosfolípidos, tales como lecitina, y emulsificantes, tales como ésteres de ácidos grasos de cadena C₁₂-C₂₄ o polímeros derivados de los anteriores, y un recubrimiento hidrofílico de quitosano.
- Calvo et al. [*J. Pharm. Pharmacol.*, 1996, 48, 1147-52] describen sistemas coloidales para la liberación de indometacina por vía ocular, constituidos por una fase oleosa de lecitina y poli-ε-caprolactona dispersa en una fase acuosa que contiene poloxámero como agente tensoactivo.
- 30 Por su parte, la solicitud EP 760 237 hace referencia a microemulsiones para la liberación de sustancias insolubles en agua, como la ciclosporina, que contienen una fase dispersa lipofílica, constituida por triglicéridos, lecitina y un surfactante, y una fase hidrofílica acuosa que contiene propilenglicol.
- La solicitud WO97/22358 describe microemulsiones en las cuales la ciclosporina se disuelve en un sistema que comprende una fase hidrofóbica, constituida por tocoferol o derivados del mismo, y una serie de componentes hidrofílicos como carbonato de propileno y polietilenglicol, así como un surfactante.
- 35 No obstante, el principal inconveniente de este tipo de sistemas coloidales es que presentan una carga neta negativa, de modo que, su puesta en contacto con determinados componentes biológicos de carácter catiónico (algunas proteínas, iones sodio y potasio) provoca la neutralización de la carga superficial, la ruptura del sistema y, consecuentemente, la pérdida del ingrediente activo. Por otra parte, estos sistemas cargados negativamente pueden sufrir además una repulsión electrostática por parte de las membranas biológicas debido a que éstas presentan también carga negativa.
- 40 Con el objetivo de superar esta limitación, se ha llevado a cabo una importante labor investigadora destinada a desarrollar sistemas coloidales que presentan una carga neta positiva y que por tanto permiten su absorción a través de entornos biológicos de carácter catiónico y/o su adhesión a las membranas biológicas (mucosa y piel).
- 45 La solicitud WO96/37232 hace referencia a sistemas basados en nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas constituidas por un núcleo lipofílico y recubiertas con quitosano para la administración de principios activos por diferentes vías. La incorporación del polímero hidrofílico quitosano en la fase acuosa confiere la carga neta positiva al mencionado sistema. Desde entonces, se han desarrollado sistemas que incorporan este polímero u otros que permiten proporcionar la deseada carga positiva.
- 50 Así, Calvo et al. [*Colloid. Polym. Sci.*, 1997, 275, 46-53] describen los mismos sistemas coloidales de la solicitud mencionada en el párrafo anterior pero incorporando además poloxámero como agente tensoactivo en la fase acuosa, para liberar moléculas lipofílicas empleando como modelo diazepamina. En la misma línea se desarrolla la publicación científica de El-Shabouri [*Intern. J. Pharmac.*, 2002, 249, 101-8] en la que, además de quitosano, se analiza el empleo de glicocolato sódico o gelatina-A en la fase acuosa, y su capacidad para la liberación de ciclosporina.
- 55

Asimismo, el artículo de Filipovic-Grcic [*J. Microencap.*, 2001, 18(1), 3-12] hace referencia a sistemas mucoadhesivos basados en un núcleo liposomal recubierto con quitosano a los que se incorpora un marcador de alto peso molecular (isotiocianato de fluoresceína-dextrano), analizándose la estabilidad del mencionado sistema en un fluido gástrico simulado, en función de la proporción de quitosano y su peso molecular.

No obstante, un importante problema técnico asociado a la utilización de este tipo de sistemas en el campo de la medicina y la cosmetología, es el relacionado con su inestabilidad, tanto durante su almacenamiento como tras su administración in vivo. En concreto, la composición de estos sistemas provoca que, durante el almacenamiento durante períodos de tiempo superiores a un mes, y a temperaturas por encima de la ambiental, el ingrediente activo se libere paulatinamente de la fase lipofílica y se desplace a la fase acuosa en la cual es insoluble, conduciendo a su precipitación y a la formación de cristales.

A la vista de estos datos, se hace especialmente necesario el desarrollo de sistemas de nanocápsulas estables, especialmente para la liberación de principios activos lipofílicos y que presenten, además de una gran capacidad para la asociación de estas moléculas y su liberación en el entorno biológico adecuado, una estabilidad claramente mejorada durante su almacenamiento y transporte, características indispensables desde el punto de vista de la aplicabilidad industrial.

Otro problema técnico es que la mayoría de estos sistemas son inestables cuando se someten a procesos de esterilización, tal como autoclavado o pasteurización. Estos procesos implican someter los sistemas a temperaturas superiores a 100°C por periodos cortos de tiempo. En general estas fuertes condiciones físicas cambian drásticamente la solubilidad de los distintos componentes y conducen a la ruptura de las emulsiones o partículas, con la formación de una fase oleosa donde se encontraría el principio activo. Por lo tanto sería altamente deseable encontrar un sistema de liberación controlada de principios activos o ingredientes cosméticos con carácter lipofílico, que se pueda administrar por vía tópica y que sea estable aún siendo sometido a procesos de esterilización.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que un sistema de nanocápsulas que comprenden un núcleo lipofílico que comprende un componente fosfolipídico y un aceite constituido por ácidos grasos de cadena C₁₂-C₂₄ saturados y/o insaturados o derivados de los mismos, y por una fase hidrofílica que comprende quitosano y un compuesto polioxialquilenado, presenta una alta estabilidad en suspensión durante períodos de tiempo de hasta más de dos años en condiciones normales de conservación, lo que representa un aspecto clave de la viabilidad industrial y comercial de estos sistemas. Además, permite una eficaz asociación y posterior liberación de moléculas altamente lipofílicas.

Una ventaja adicional derivada de estos sistemas es su capacidad para ser sometidos a un procedimiento de esterilización a altas temperaturas manteniendo su estructura y propiedades, como el tamaño de partícula y carga medida por el potencial zeta. Este aspecto es fundamental cuando se requiere su empleo, por ejemplo, en aplicaciones oculares donde la esterilización es necesaria. Además, la posibilidad de esterilización de estos sistemas permite reducir, y en algunos casos eliminar, la necesidad de emplear conservantes en las formulaciones finales.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un sistema que comprende nanocápsulas con un tamaño medio inferior a 1 µm dispersas en un medio acuoso, donde las nanocápsulas tienen una estructura que comprende:

a) una fase lipofílica que comprende:

a.1) al menos, un componente fosfolipídico; y

a.2) un aceite que comprende uno o más ácidos grasos de cadena C₁₂-C₂₄ saturados y/o insaturados o derivados de los mismos;

b) una fase hidrofílica que comprende:

b.1) quitosano o un derivado del mismo; y

b.2) un compuesto polioxialquilenado.

Un segundo objeto de la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un sistema tal como el que se ha definido previamente y que además comprende una molécula activa capaz de prevenir, aliviar o curar enfermedades.

Otro objeto de la invención se relaciona con una composición cosmética que comprende un sistema tal como el que se ha definido previamente. En una variante de la invención dicha composición cosmética puede además incorporar una molécula comercialmente activa.

Un último objeto de la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de un sistema como el definido previamente que comprende:

a) preparación de la fase lipofílica mediante la disolución en un disolvente orgánico del componente fosfolipídico y del aceite, y opcionalmente una molécula lipofílica como ingrediente activo;

- b) preparación de la fase hidrofílica mediante la disolución en agua del quitosano y el compuesto polioxialquileno;
- c) calentamiento de ambas fases a una temperatura comprendida entre 40 y 60°C;
- d) mezclado de las fases lipofílica e hidrofílica bajo agitación con formación espontánea de las nanocápsulas;
- e) eliminación del disolvente orgánico.

Los sistemas y composiciones de la invención son especialmente adecuados para la administración de moléculas biológicamente activas con un carácter lipofílico, y que se incorporan a la fase lipofílica de las nanocápsulas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El sistema de la presente invención comprende nanocápsulas que se encuentran dispersas en un medio acuoso, donde dichas nanocápsulas tienen una estructura que comprende una fase lipofílica, en la cual se puede incorporar un ingrediente activo, y una fase hidrofílica.

Por el término "nanocápsula" se entiende una estructura constituida por un núcleo de naturaleza lipofílica rodeado por una fase hidrofílica que comprende quitosano con carga positiva que "encapsula" el núcleo. La nanocápsula está dispersa en un medio acuoso, donde dicho medio acuoso puede comprender disueltas cantidades adicionales de quitosano y/o de otros polímeros hidrofílicos. La interacción iónica resultante entre los distintos componentes lipofílicos e hidrofílicos de la nanocápsula genera entidades físicas características, independientes y observables, cuyo tamaño medio es inferior a 1 µm, es decir, un tamaño medio comprendido entre 1 y 999 nm.

Por "tamaño medio" se entiende el diámetro promedio de la población de nanocápsulas, que comprenden la fase lipofílica y la fase hidrofílica, que se mueve conjuntamente en el medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental más abajo.

Las nanocápsulas del sistema de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula inferior a 1 µm, preferentemente tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 50 y 800 nm. El tamaño medio de las cápsulas se ve influenciado principalmente por la cantidad del componente fosfolipídico (a cantidades mayores, el tamaño resultante es más pequeño), por la cantidad y peso molecular del quitosano (a mayor cantidad o peso molecular el tamaño se incrementa), la densidad del aceite utilizado, y por parámetros del procedimiento de preparación, tal como velocidad de agitación y temperatura de ambas fases en el proceso de mezclado.

Por otra parte, las nanocápsulas pueden presentar una carga superficial (medida mediante el potencial zeta) atribuida a los grupos amino del quitosano, cuya magnitud puede variar desde +1 mV hasta +70 mV.

Fase lipofílica

La fase lipofílica que está presente en la nanocápsula comprende al menos un componente fosfolipídico y un aceite constituido por uno o varios ácidos grasos de cadena larga (C₁₂-C₂₄) saturados y/o insaturados, o derivados de los mismos. Su función es la de albergar el ingrediente activo lipofílico cuando está presente, tanto si es activo en el sentido farmacológico como cosmético, que posteriormente se liberará en el entorno biológico adecuado.

Componente fosfolipídico

En la presente descripción se entiende como componente fosfolipídico un tipo de lípidos iónicos, que en su forma más simple están compuestos por un glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. Usualmente el grupo fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos, que frecuentemente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolamina y muchas veces posee una carga eléctrica. Otros fosfolípidos se derivan del aminoalcohol esfingosina o dihidroesfingosina (esfingolípidos), y no necesariamente del glicerol. El compuesto resultante presenta una parte lipofílica por las cadenas de los ácidos grasos y una parte hidrofílica por el grupo fosfato y la carga eléctrica.

En el sistema de la invención el componente fosfolipídico se selecciona preferentemente entre fosfoglicéridos, esfingolípidos, cefalina y mezclas de los mismos. Los fosfoglicéridos, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico, son lípidos formados por aceites grasos, glicerina, ácido fosfórico y alcohol (por ejemplo colina, serina, etanolamina, glicerina o inositol). Los esfingolípidos como la esfingomielina están formados por esfingosina, un ácido graso, ácido fosfórico y un alcohol o aminoalcohol. La cefalina está formada por glicerina, ácido fosfórico, dos ácidos grasos y dos bases alcoholes (colina y esfingosina).

En una realización preferente de la invención, el componente fosfolipídico comprende fosfoglicéridos. Más preferentemente comprende fosfoglicéridos seleccionados entre fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico o mezclas de los mismos.

En una variante preferida el componente fosfolipídico es lecitina. Preferentemente se utiliza lecitina de soja ya que se encuentra comercialmente disponible, aunque también se puede emplear lecitina de huevo.

La lecitina es una mezcla compleja de compuestos lipídicos, en donde los mayoritarios son compuestos fosfolípidos, en concreto fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y lisofosfatidilcolina. En general, las lecitinas se designan por su nombre comercial y un número que indica el porcentaje de fosfatidilcolina en su composición. El porcentaje de la fosfatidilcolina en las lecitinas puede variar entre 35% hasta prácticamente el 100%, no obstante en la presente invención se emplean preferentemente lecitinas en donde este porcentaje se encuentra comprendido entre 35% y 75%, preferentemente entre 35% y 55%. El empleo de lecitinas con un porcentaje muy alto de fosfatidilcolina (superior al 80%) no es aconsejable puesto que da lugar a la presencia de aceite libre en la suspensión de las nanocápsulas. En este sentido, son varias las lecitinas disponibles en el mercado que reúnen la característica de presentar un porcentaje de fosfatidilcolina no superior al 80%. Así se utilizan preferentemente Epikuron 135F, Epikuron 145V, Epikuron 170, Lipoid S30, Lipoid S45 y Lipoid S75.

Asimismo, la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina influye en la formación de nanocápsulas con propiedades adecuadas de estabilidad. Así, se ha demostrado que el empleo de Epikuron 135F, en donde la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina es aproximadamente de 7/1 y la proporción de fosfatidilcolina es mayor de 35% en la composición, proporciona los mejores resultados de estabilidad.

15 Aceite

Por su parte, el aceite comprendido en la fase lipofílica está constituido por uno o varios ácidos grasos de cadena C₁₂-C₂₄ saturados y/o insaturados o derivados de los mismos. Ejemplos de dichos ácidos grasos incluyen, aunque no se limitan a ellos, ácidos grasos saturados como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido acádico, ácido carnálico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico o ácido cerótico; ácidos grasos monoinsaturados como ácido lauroleico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido vaccénico, ácido gadoleico, ácido cetoleico, o ácido erúrico; ácidos grasos poliinsaturados como ácido linoleico, ácido linolénico, ácido gamma linolénico, ácido estearidónico, ácido araquidónico, ácido clupanodónico o ácido docosahexaenoico.

Asimismo, se pueden emplear derivados de estos ácidos grasos, entendiéndose por esta definición aquellos compuestos con un fuerte carácter lipofílico y producidos como consecuencia de la reacción del grupo ácido con alcoholes o amins, tales como por ejemplo los ésteres o amidas de dichos ácidos grasos. De la misma forma, se incluyen en la definición de derivados de ácidos grasos aquellos ácidos grasos, sus ésteres o sus amidas que presentan hidroxilo, grupos éter o grupos alquilo como sustituyentes de la cadena hidrocarbonada, como por ejemplo ácido cerebrónico, ácido hidroxinervónico, ácido ricinoleico, ácido tuberculoesteárico o ácido fitánico; o aquellos ácidos grasos que presentan una estructura cíclica en la cadena hidrocarbonada, tales como ácido lactobacílico o chaulmógrico.

De forma general, se puede emplear cualquier aceite de origen vegetal, como por ejemplo aceite de girasol, de maíz, de soja, de algodón, de cacahuete, de soja, de onagra, de borraja, de oliva, de coco, de palma, de cáñamo, de cárcamo, de hueso o de semillas de albaricoque, de germen de trigo, de germen de maíz, de manteca de karité, de macadamia, de almendra, de aguacate, de caléndula, de pepita de uva, sésamo, de jojoba, de avellana, etc.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la incorporación de este tipo de aceite en la composición de las nanocápsulas es particularmente relevante para conferir una elevada estabilidad al sistema durante largos periodos de tiempo si se compara con otros aceites empleados en el estado de la técnica como los aceites denominados comercialmente Migliol o Labrafac. En concreto, se ha observado mediante ensayos simulados en condiciones aceleradas que el sistema de la invención es estable durante 5-6 meses, a temperaturas en torno a 37°C, lo que equivale a casi dos años en condiciones normales de conservación a temperatura ambiente. Cuando se compara con los resultados con otro tipo de aceites como Migliol 840 y Labrafac Lipophile (constituidos por una mezcla de diésteres o triglicéridos de ácidos grasos de cadena C₈-C₁₀ saturados) se ha visto que aumenta hasta 6 veces la estabilidad del sistema.

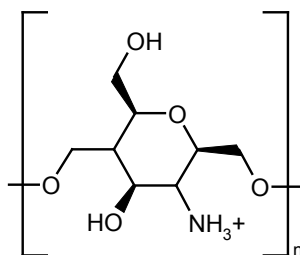
En una realización preferente de la invención, el aceite comprendido en la fase lipofílica es aceite de ricino. Dicho aceite es obtenido por prensado en frío de las semillas de *Ricinus Communis* L., no obstante es un producto disponible comercialmente. Presenta una composición de ácidos grasos de cadena larga (C₁₆-C₁₈): 2% (máximo) de ácido palmítico, 2.5% (máximo) de ácido esteárico, 2.5-6.0% de ácido oleico, 2.5-7.0% de ácido linoleico, 1% (máximo) de ácido linolénico y 85-92% de ácido ricinoleico.

Fase hidrofílica

La fase hidrofílica comprende quitosano o un derivado del mismo y un compuesto polioxialquilenado que actúa como agente tensioactivo, además de agua. La función de esta fase es probablemente la de recubrir la nanocápsula, además de dotarla de una carga positiva que permita su absorción a través de entornos biológicos de carácter catiónico o adsorción sobre ellos.

Quitosano

El quitosano es un polímero de origen natural derivado de la quitina (poli-N-acetil-D-glucosamina), donde una parte importante de los grupos acetilo de los N se han eliminado por hidrólisis. El grado de desacetilación es preferentemente mayor de 40%, más preferentemente mayor de 60%. En una variante está comprendido entre 60-98%. Presenta por lo tanto estructura aminopolisacárido y carácter catiónico. Comprende la repetición de unidades monoméricas de fórmula (I):



(I)

donde n es un número entero, y además m unidades donde el grupo amino está acetilado. La suma de $n+m$ representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de quitosano.

El quitosano empleado para la obtención de las nanocápsulas de la presente invención tiene un peso molecular comprendido entre 2 y 2000 kDa, preferentemente entre 2 y 500 kDa, más preferentemente entre 5 y 150 kDa. Ejemplos de quitosanos comerciales que se pueden utilizar son UPG 113, UP CL 213 y UP CL113 que se pueden obtener de NovaMatrix, Drammen, Norway.

Como alternativa al quitosano se puede utilizar asimismo un derivado del mismo, entendiéndose como tal un quitosano en el que se ha modificado uno o más grupos hidroxilos y/o uno o más grupos amino, con el fin de elevar la solubilidad del quitosano o incrementar el carácter adhesivo del mismo. Estos derivados incluyen, entre otros, quitosanos acetilados, alquilados o sulfonados, derivados tiolados, tal como se describe en Roberts, *Chitin Chemistry*, Macmillan, 1992, 166. De forma preferente cuando se utiliza un derivado se selecciona entre O-alquileterés, O-acilésteres, trimetilquitosano, quitosanos modificados con polietilenglicol, etc. Otros derivados posibles son las sales, tales como citrato, nitrato, lactato, fosfato, glutamato, etc. En cualquier caso, el experto en la materia sabe identificar las modificaciones que se pueden realizar sobre el quitosano sin afectar a la estabilidad y viabilidad comercial de la formulación final.

Compuesto polioxialquilenado

Por su parte, por compuesto polioxialquilenado se entiende un polímero hidrofílico sintético de carácter no iónico que presenta en su estructura unidades de óxido de alqueno, siendo preferente el empleo de un polioxietileno (PEO) o un copolímero óxido de etileno-óxido de propileno (PEO-PPO). En este último caso, cuando se emplea un copolímero de PEO y PPO, la proporción de PEO en el copolímero puede oscilar entre 10% y 80% en peso, siendo el resto (hasta 100%) PPO.

Estos polímeros se comercializan con distintos pesos moleculares, no obstante, en la presente invención se prefiere el empleo de derivados polioxietilenados que presentan pesos moleculares comprendidos entre 1000 y 25000. En una realización preferente, el derivado polioxietilenado es un copolímero tribloque (PEO-PPO-PEO), como por ejemplo los denominados comercialmente Poloxamer. Se han obtenido buenos resultados por ejemplo con Pluronic F68 (Poloxamer 188).

El compuesto polioxialquilenado se emplea como agente tensoactivo en el sistema y su presencia es particularmente necesaria para conferir estabilidad al mismo, ya que en caso contrario, las nanocápsulas se agregan durante el almacenamiento. Así, en su ausencia se ha observado un incremento del tamaño de partículas transcurridas dos semana a 37°C. Además, se ha podido demostrar que la incorporación de este compuesto no afecta apenas al tamaño de las nanocápsulas formadas como se puede apreciar en la tabla I.

Tabla I: Influencia de la cantidad de poloxámero en la estabilidad de las nanocápsulas

poloxámero (mg)	tamaño inicial	tamaño tras 2 semanas a 37°C
0	492	754
125	482	475
205	439	442
500	410	423

En una variante de la invención el sistema tiene una proporción de componente fosfolipídico que está preferentemente entre 0.1% y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.5% y 5%, más preferentemente entre 1% y 2.5% en peso. Proporciones menores del 0.1% del componente fosfolipídico no serían recomendables dado que daría lugar a la presencia de aceite libre en la suspensión de las nanocápsulas; por el contrario, una proporción superior al 10% podría dar lugar a la formación de partículas y no sistemas encapsulados debido a la interacción quitosano con carga positiva-componente lipídico con carga negativa.

Por otro lado, en otra variante de la invención la proporción de aceite en el sistema oscila entre 1%-20%, preferentemente entre 2.5% y 10%, en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua. Cantidades

menores conllevan la disminución de ingrediente activo que puede ser encapsulado, mientras que cantidades superiores obligan a aumentar la proporción de otros componentes, como el componente fosfolipídico, para evitar la presencia de aceite libre en el sistema.

En otra variante de la invención la proporción de quitosano, o de un derivado del mismo, está preferentemente comprendida entre 0.05% y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1% y 2%, y más preferentemente entre 0.25% y 1%. Proporciones superiores a las mencionadas provocan un incremento en la viscosidad de la suspensión, lo cual puede ser ventajoso para algunas aplicaciones pero dificulta notablemente la etapa de eliminación del solvente y concentrado de la formulación,

Por su parte, la proporción del compuesto polioxialquilenado está preferentemente comprendida entre 0.05% y 10% en peso, preferentemente entre 0.1% y 5% en peso, más preferentemente entre 1% y 2.5%.

En todos los casos la proporción restante corresponde mayoritariamente a agua purificada donde se encuentran dispersas las nanocápsulas. Esto no significa que otros ingredientes no puedan estar presentes, bien en las nanocápsulas (uno o más principios activos lipofílicos, ingredientes cosméticos, etc), bien en el medio acuoso donde están dispersas (agentes viscosizantes, conservantes, aromatizantes, etc) o bien adsorbidos sobre ellas (principios activos hidrofílicos, ácido hialurónico, etc).

En una variante del sistema de la invención, las nanocápsulas se encuentran dispersas en un medio acuoso que comprende además un polímero hidrofílico, cuya función es conferir propiedades viscosizantes al sistema, aumentando en gran medida la densidad del mismo. La adición de este componente se debe a que el sistema de nanocápsulas dispersas en medio acuoso de la invención, resulta en algunos casos demasiado fluido desde el punto de vista de su aplicación, especialmente cuando se desean fabricar composiciones farmacéuticas o cosméticas semisólidas como geles, cremas, pomadas o ungüentos. Entre los polímeros hidrofílicos con carácter viscosizante pueden emplearse, entre otros, carbohidratos y derivados, ácidos carboxílicos, poliglicoles como polivinilalcohol, derivados de polivinilpirrolidona, quitosano o un derivado del mismo, poloxámeros, polietilenglicol, ácido hialurónico o mezclas de los mismos.

En otra variante de la invención se incorpora, después de la formación de las nanocápsulas, ácido hialurónico o sus sales en el medio acuoso, debido a sus distintas propiedades y funciones. Por un lado se absorbe sobre las nanocápsulas variando algunas de sus propiedades como la carga. Por otro, se ha visto que puede favorecer la interacción con membranas celulares y con la mucina (proteína presente en la mucosa). Adicionalmente, dependiendo de la cantidad utilizada, puede quedar disuelto en el medio acuoso y contribuye a modular la viscosidad del sistema. En todo caso, se ha visto que no afecta negativamente a las propiedades del sistema, en particular a las medidas de tamaño y potencial zeta del sistema, como se puede ver en la tabla II.

Tabla II. Tamaño y potencial zeta de las nanocápsulas tras la incorporación del ácido hialurónico.

quitosano:ác.hialurónico (mg)	tamaño (nm)	potencial zeta (mV)
50:0	330	+61,6
50:10	312	+51,0
50:20	372	+38,1
50:30	481	+29,3

Una de las aplicaciones más interesantes del sistema de la invención es para la administración de moléculas lipofílicas, especialmente cuando se trata de compuestos farmacológicamente o cosméticamente activos. Los sistemas descritos en la invención presentan una alta capacidad de asociación de moléculas lipofílicas biológicamente activas en el interior de las nanocápsulas.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención consiste en una composición farmacéutica que comprende el sistema de nanocápsula previamente definido y una molécula lipofílica capaz de prevenir, aliviar o curar enfermedades.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (por ejemplo, suspensión o dispersión de nanocápsulas) para su aplicación oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal o vaginal, o cualquier composición en forma de gel, ungüento, crema o bálsamo para su administración tópica, ocular, nasal o vaginal.

En un aspecto preferido, la formulación se administra vía mucosa. La superficie positivamente cargada de las nanocápsulas provee una mejor absorción de los fármacos sobre la superficie de la mucosa vía su interacción con la mucosa y las superficies de las células epiteliales que están negativamente cargadas.

En otro aspecto preferido, la formulación se administra por vía intradérmica o transdérmica, entendiéndose como tal la administración a través o sobre la piel. Esta forma de administración es particularmente relevante puesto que el sistema de la invención no solamente estimula la absorción y penetración de los fármacos por ruta transdérmica, sino también la adhesión del sistema sobre la superficie dérmica y subsiguiente liberación controlada del componente activo (tipo "depot").

El término “molécula lipofílica biológicamente activa” se refiere a cualquier sustancia de carácter lipofílico que se emplea en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que es empleada para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales. Estas moléculas de carácter lipofílico pueden incluir proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos modificados (lipofilizados), corticosteroides, vitaminas lipofílicas, como A, D, K y E, agentes antifúngicos, agentes bacteriostáticos, agentes cicatrizantes, agentes antihistamínicos, agentes anestésicos, agentes antipruriginosos, agentes antipsorásicos, agentes antibióticos, agentes antivirales, agentes antisépticos, agentes antiacnéicos, agentes despigmentantes, agentes antiseborreicos, agentes inmunosupresores, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antiinflamatorios derivados del Capsicum.

En una realización preferente la molécula lipofílica biológicamente activa es ciclosporina.

En otra realización preferente la molécula lipofílica biológicamente activa es un corticosteroide como por ejemplo hidrocortisona, prednisona, fluticasona, prednisolona, triamcinolona, triamcinolona acetona, dexametasona, betametasona, beclometasona, beclometasona dipropionato.

En una variante preferida el corticosteroide es valerato de betametasona.

Debido a sus buenas propiedades para la administración en o a través de la piel, y debido a sus características de estabilidad a largo plazo, los sistemas de la invención son también muy adecuados para aplicaciones cosméticas.

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención consiste en una composición cosmética que comprende el sistema de nanocápsula previamente definido. Estas composiciones cosméticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de nanocápsulas) o cualquier composición que comprende el sistema de la invención y que está en forma de gel, crema, ungüento o bálsamo para su administración tópica. Dichas composiciones se caracterizan porque tienen propiedades emolientes, protectoras y cicatrizantes aún cuando ellas no tengan asociada ninguna molécula cosméticamente activa.

En una variante de la invención, la composición cosmética puede incorporar también moléculas activas de naturaleza lipofílica que, aunque no tengan ningún efecto terapéutico, tienen propiedades como agentes cosméticos. Entre las moléculas de naturaleza activas que pueden ser incorporadas en las nanocápsulas se pueden citar agentes emolientes, conservadores, aromatizantes, agentes antiacnéicos, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, anticapa, antiseborreicos, colorantes, bronceadores, absorbentes de luz UV, enzimas, sustancias aromatizantes, entre otros.

La proporción de ingrediente activo encapsulado en las nanocápsulas puede llegar a ser hasta un 5% en peso con respecto al peso total del sistema incluyendo el agua; cantidades mayores reducirían la estabilidad del sistema y obligarían a la adición de mayor cantidad de componente fosfolipídico para poder encapsular todo el ingrediente activo. No obstante la proporción adecuada dependerá en cada caso del ingrediente activo a encapsular. En el caso concreto de incorporar ciclosporina como ingrediente activo, la proporción de ésta en dicho sistema estaría comprendida entre 0.01% y 5% en peso, preferentemente entre 0.1% y 2%. Sin embargo, cuando se incorpora valerato de betametasona, el porcentaje de este ingrediente estaría comprendido en el sistema entre 0.01% y 3%, preferentemente entre 0.05% y 0.5%.

Las composiciones farmacéuticas y cosméticas pueden comprender además agentes controladores de pH como por ejemplo agentes tampón, los cuales evitan que el pH de la composición disminuya a valores por debajo de 5, agentes antioxidantes, que inhiben la oxidación del componente fosfolipídico y del aceite, así como conservantes que evitan cambios estructurales importantes en la formulación. Así, en una variante se emplea en la fase lipofílica un tampón citrato, que tiene una función dual dado que permite controlar el pH y actuar al mismo tiempo como agente antioxidante, y en la fase hidrofílica parabenos como agentes conservantes.

Dependiendo de su función, estos componentes adicionales pueden estar presentes en las fases que componen las nanocápsulas o bien en el medio acuoso donde éstas se encuentran dispersas o bien absorbidos total o parcialmente sobre ellas. El experto en la materia puede determinar qué componentes adicionales se pueden utilizar y si son necesarios, siendo muchos de ellos de uso común en composiciones farmacéuticas y cosméticas.

En otro aspecto de la invención, el sistema que comprende las nanocápsulas también se puede utilizar para la administración de principios activos que no tienen un carácter fuertemente lipofílico. En ese caso no son encapsulados en las nanocápsulas sino que se absorben sobre la superficie de éstas. Esta variante puede ser muy útil para la preparación de sistemas estables para la administración de moléculas biológicamente activas de carácter hidrófilo, tal como péptidos, proteínas, hormonas (insulina, LRH, LD, etc.), antígenos/alergenos (toxina tetánica, toxina diftérica, etc.) según el objetivo sea generar una respuesta inmune o tolerancia, anticuerpos, heparina (de bajo peso molecular y no fraccionada), ADN, ARN y oligonucleótidos, entre otros.

Un último objeto de la invención se relaciona con un procedimiento para la elaboración del sistema de la invención tal como está definido más arriba, y que comprende nanocápsulas. Dicho procedimiento comprende, por una parte, la preparación de la fase lipofílica mediante la disolución del componente fosfolipídico y del aceite en un disolvente orgánico. La incorporación del ingrediente lipofílico activo opcional, farmacéutico o cosmético, se lleva a cabo mediante disolución del mismo en esta fase lipofílica junto con el componente fosfolipídico y el aceite, sin importar el orden de adición de los componentes en la disolución.

La elección del disolvente orgánico dependerá en gran medida del ingrediente activo incorporado. Aunque es preferible el empleo de disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo etanol e isopropanol, en algunos casos, como cuando se desea encapsular ciclosporina, se recurre al empleo de acetona, puesto que disolventes como etanol o isopropanol, muy afines por la ciclosporina, provocan la difusión del ingrediente activo a la fase acuosa durante el posterior mezclado de la fase acuosa y la fase lipofílica, tal como se puede ver en la siguiente tabla.

Tabla III. Influencia de la cantidad de ciclosporina y tipo de disolvente orgánico en la formación de las nanocápsulas

carga de ciclosporina	disolvente orgánico	temperatura	quitosano	resultado
1%	etanol	50°C	100 mg	agregados
	isopropanol			agregados
0.5%	acetona			nanocápsulas
2%	acetona			nanocápsulas

Es preferible utilizar la menor cantidad posible de disolvente orgánico, puesto que además tendrá que ser eliminado total o parcialmente durante el resto del proceso.

En una realización particular, se adiciona el disolvente orgánico sobre una cantidad de componente fosfolipídico comprendido entre 0.005% y 0.015% en peso, una cantidad de aceite de aproximadamente 0.025 % en peso y una cantidad de ingrediente activo comprendido entre 0.0025% y 0.005% en peso, estando todos los porcentajes medidos con respecto al peso total de disolvente orgánico.

Por otra parte, se procede a la preparación de la fase hidrofílica mediante la disolución en agua del quitosano y del compuesto polioxialquilenado. En una realización preferente, se disuelve en agua, entre 0.0005% y 0.002% en peso de quitosano y entre 0.001% y 0.005% en peso de compuesto polioxialquilenado, estando todos los porcentajes medidos con respecto al peso total de agua.

A continuación, ambas fases se calientan a una temperatura comprendida entre 40° y 60°C, preferentemente a 50°C y posteriormente se procede al mezclado de las mismas. Esto es sorprendente dado que no es esperable que las nanocápsulas, y un sistema estable, se formen en ese rango de temperaturas. Se ha podido observar que si se calienta por encima de ese máximo, las preparaciones resultantes no serían adecuadas debido a la existencia de aceite libre en la suspensión. Por el contrario, si se calientan por debajo de 40°C se observa el comienzo de la solidificación de los componentes lipofílicos. Esta etapa de mezclado se puede realizar tanto adicionando la fase acuosa sobre la orgánica, como la fase orgánica sobre la acuosa, dado que el orden de adición no afecta a las características del sistema. Al efectuar la mezcla de ambas fases, se forman de manera espontánea las nanocápsulas mediante un proceso de desplazamiento de solvente, en donde al incorporar una fase sobre la otra, el solvente orgánico difunde a la fase acuosa, formándose unas gotículas lipídicas constituidas por el componente fosfolipídico, el aceite y opcionalmente el ingrediente activo. Estas últimas se caracterizan por ser altamente negativas, provocando la inmediata ubicación del quitosano alrededor de ellas, mediante interacción iónica debido a la carga positiva que presenta este polímero, el cual provoca además que la carga superficial del sistema sea también positiva.

Una vez que se han formado las nanocápsulas, el disolvente orgánico utilizado se elimina mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. La eliminación del disolvente orgánico se debe a que su presencia no es aconsejable en formulaciones farmacéuticas.

A continuación, uno de los procedimientos habituales en la preparación de sistemas nanocapsulares es la concentración del mismo para aumentar la concentración de los componentes. En la presente invención se ha observado que el volumen inicial se puede concentrar inesperadamente hasta un volumen 17 veces menor del de formación de las nanocápsulas, por debajo del cual el sistema podría empezar a perder estabilidad.

Tras la eliminación del disolvente orgánico o tras la etapa de concentración se pueden adicionar agentes adicionales que se han descrito más arriba (viscosizantes, ácido hialurónico o sus sales, conservantes, etc).

Si el sistema se va a utilizar para la administración de moléculas biológicamente activas no lipofílicas, éstas se pueden adicionar tras la formación de las nanocápsulas o tras la eliminación del disolvente orgánico.

Además, se ha podido observar de forma sorprendente que el sistema de nanocápsulas dispersas en fase acuosa de la presente invención puede ser sometido a un proceso de esterilización por altas temperaturas, sin afectar su estabilidad. Dicho procedimiento incluye por ejemplo un proceso de autoclavado, de tyndalización, HTST (alta temperatura en tiempo reducido), UHT (temperatura ultra elevada). Estos procesos son conocidos por el experto en la materia y se realizan con el fin de poder utilizar el sistema de la invención en aplicaciones que requieran su esterilización como es el caso de la aplicación por vía ocular. Asimismo, otra ventaja derivada de esta característica es la de permitir reducir considerablemente el uso de conservantes en la fabricación de formulaciones comerciales dirigidas a otras vías de administración.

Las condiciones empleadas en general para la esterilización por altas temperaturas podrían provocar la fusión de las nanocápsulas y por tanto la liberación del ingrediente activo. No obstante, se ha podido observar, que las

nanocápsulas de la presente invención mantienen su tamaño y carga superficial tras el proceso de esterilización y además no se aprecia la aparición de cristales de ingrediente activo en el sistema. Esto pone de manifiesto que no existe liberación del mencionado ingrediente activo desde las nanocápsulas a la fase acuosa.

Como característica adicional, resulta de extrema importancia que los sistemas que han sido sometidos al proceso de esterilización son además estables durante largos periodos de tiempo, habiéndose probado en ensayos acelerados su estabilidad durante al menos 4 meses a 37°C, equivalente a más de un año en condiciones normales, como se demuestra en los ejemplos que acompañan a la invención, confirmando así la viabilidad industrial y comercial de estos sistemas.

A continuación, se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención.

Ejemplos

Como procedimiento común a los ejemplos que se detallan a continuación, las nanocápsulas se han caracterizado desde el punto de vista de tamaño, potencial zeta (o carga superficial), eficacia de encapsulación y presencia de cristales de ciclosporina A. Los estudios de estabilidad de las nanocápsulas se realizaron en una estufa Heidolph (Titramax 1000) y los procesos de autoclavado en un Presoclave 75 (Selecta).

La *Distribución de Tamaño* se ha realizado mediante espectroscopia de correlación fotónica (PCS; Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) obteniéndose valores de tamaño medio de la población de nanopartículas.

El *Potencial zeta* se ha medido mediante Anemometría de láser Doppler (LDA; Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Para la determinación de la movilidad electrofórica, las muestras fueron diluidas en agua Milli-Q.

La *liberación de la Ciclosporina A y del Valerato de Betametasona* de las nanocápsulas de quitosano se ha evaluado de forma visual, observando si existe la formación de cristales en la fase acuosa y cuantificando mediante HPLC la concentración de ciclosporina (máxima solubilidad en fase externa 16 µg/ml) o valerato de Betametasona (máxima solubilidad en fase externa 5 µg/ml), según el principio activo encapsulado. De esa forma, si la cantidad cuantificada en la fase externa es igual a la máxima solubilidad de principio activo se deduce que existe la formación de cristales, aunque no sean visibles.

El quitosano (Protasan UP CI 113) utilizado en los ejemplos es procedente de NovaMatrix-FMC Biopolymer, la Ciclosporina A de LC Laboratories, el Valerato de Betametasona de Guinama, el aceite de ricino de Galindo, la fosfatidilcolina de Degussa (Epikuron 135F), el poloxamer 188 de BASF Corporation, la acetona de Vorquímica (Analema) y el resto de productos utilizados proceden de Sigma Aldrich, sacarosa, glucosa y manitol.

Ejemplo 1

Estudio de estabilidad de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A en suspensión a 37°C

Se prepararon nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A como se describe a continuación:

- Preparación de la fase oleosa con 250 mg de lecitina, 0,5 ml de aceite de ricino, 50 ó 100 mg de ciclosporina A y 25 ml de acetona.
- Preparación de la fase acuosa con 50 mg de quitosano, 125 mg de poloxamer 188 y 100 ml de agua destilada.
- Ambas fases se calientan a 50°C, y a continuación se adiciona la fase orgánica sobre la fase acuosa, formándose espontáneamente las nanocápsulas.

A continuación se procede a eliminar la acetona mediante la aplicación de calor (37°C) a vacío y posteriormente se procede a concentrar el volumen restante hasta que queden 10 mL de agua.

Las nanocápsulas resultantes de esa preparación presentaron tamaño nanométrico inferior a 1 micra, y más concretamente entre 200-700 nm, potencial zeta positivo (+10mV- +70mV), una eficacia de encapsulación de la ciclosporina A de prácticamente el 100% (esto fue cuantificado directamente tras la degradación y extracción del compuesto activo, e indirectamente tras la cuantificación en la fase acuosa externa).

Esas nanocápsulas fueron sometidas a un estudio de estabilidad, en el cual se almacenaron a 37°C durante 6 meses, midiendo el tamaño de partícula, el potencial zeta y la presencia de ciclosporina en la fase acuosa a intervalos de 1 mes. Debido a que la ciclosporina no es soluble en agua, en caso de inestabilidad la tendencia es a precipitar y da lugar a la aparición de cristales visibles.

Tabla I:

Características de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A (1%) almacenadas a 37°C (Media $\pm$ DE).

Tiempo a 37°C (meses)	Tamaño (nm)	Potencial Zeta (mV)	Presencia de cristales de ciclosporina A
0	474 $\pm$ 42	+42 $\pm$ 3	NO
2	541 $\pm$ 26	+37 $\pm$ 2	NO

Como aparece reflejado en la Tabla I, las nanocápsulas con ciclosporina al 1%, mantienen un diámetro inferior a una micra, un potencial zeta positivo, y son estables durante al menos 2 meses a 37°C.

Tabla II:

Características de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A (0,5%) almacenadas a 37°C (Media $\pm$ DE).

tiempo a 37°C (meses)	tamaño (nm)	potencial zeta (mV)	presencia de cristales de ciclosporina A	concentración en fase acuosa externa
0	452 $\pm$ 11	+36 $\pm$ 4	NO	< 16 μ g/ml
2	601 $\pm$ 28	+21 $\pm$ 5	NO	< 16 μ g/ml
3	585 $\pm$ 13	+30 $\pm$ 1	NO	< 16 μ g/ml
4	490 $\pm$ 4	+28 $\pm$ 2	NO	< 16 μ g/ml
5	396 $\pm$ 4	+29 $\pm$ 5	NO	< 16 μ g/ml

Como puede observarse en la Tabla II, las nanocápsulas de quitosano que llevan incorporada ciclosporina A (0,5%), son estables al menos durante 5 meses a 37°C, manteniendo un diámetro inferior a 1 μ m, potencial zeta positivo y ausencia de formación de cristales de ciclosporina A, indicando que la molécula permanece en el núcleo oleoso de las nanocápsulas. El sistema es estable en cuanto a tamaño y potencial, un mínimo de 6 meses (tiempo máximo del estudio).

Ejemplo 2

Estudio de estabilidad de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A al proceso de autoclave

Se prepararon nanocápsulas de quitosano con Ciclosporina A según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, y a continuación una alícuota fue sometida a un proceso de autoclavado (120°C durante 20 min). El objetivo principal de este estudio fue evaluar si el tamaño y potencial de las nanocápsulas se había modificado durante el proceso del autoclavado.

Tabla III:

Características de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A después de un proceso de autoclavado (Media $\pm$ DE)

	tamaño (nm)	potencial zeta (mV)	presencia de cristales de ciclosporina A	concentración en fase acuosa externa
Antes del proceso de Autoclavado	575 $\pm$ 5	+ 42.1 $\pm$ 0.7	NO	< 16 μ g/ml
Después del proceso de autoclavado	591 $\pm$ 11	+ 46.2 $\pm$ 0.8	NO	< 16 μ g/ml

Como puede observarse en la Tabla III, las nanocápsulas después del proceso de autoclavado mantienen su tamaño y carga superficial. Además, después del proceso de autoclavado no aparecen cristales de ciclosporina A, lo

cual pone de manifiesto que no existe una liberación significativa de la molécula activa desde las nanocápsulas a la fase acuosa.

Ejemplo 3

Estudio de estabilidad de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A autoclavadas en suspensión a 37°C

Se prepararon nanocápsulas de quitosano con Ciclosporina A según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, luego se autoclavaron siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 2, y se almacenaron a 37°C durante 5 meses. Con el objetivo de evaluar la estabilidad de este sistema, se midió el tamaño de partícula, el potencial zeta y la presencia de cristales de ciclosporina en la fase acuosa a intervalos de 1 mes.

Tabla IV:

Características de las nanocápsulas de quitosano con ciclosporina A autoclavadas y almacenadas a 37°C (Media $\pm$ DE).

Tiempo a 37°C (meses)	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Presencia de cristales de ciclosporina A	Concentración en fase acuosa externa
0	591 $\pm$ 11	+ 46 $\pm$ 1	NO	< 16 μ g/ml
2	635 $\pm$ 15	+ 41 $\pm$ 1	NO	< 16 μ g/ml
3	506 $\pm$ 17	+ 51 $\pm$ 1	NO	< 16 μ g/ml
4	485 $\pm$ 9	+ 47 $\pm$ 1	NO	< 16 μ g/ml

Las nanocápsulas con ciclosporina A, recubiertas de quitosano, y autoclavadas, son estables a 37°C, al menos, 4 meses (Tabla IV).

Ejemplo 4

Preparación de las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona

Se prepararon nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona como se describe a continuación:

- preparación de la fase oleosa con 250 mg de lecitina, 0,5 ml de aceite de ricino, 10 mg de Valerato de Betametasona y 25 ml de acetona.
- preparación de la fase acuosa con 50 mg de quitosano, 125 mg de poloxamer 188 y 100 ml de agua destilada.
- ambas fases se calientan a 50°C, y a continuación se adiciona la fase orgánica sobre la fase acuosa, formándose espontáneamente las nanocápsulas.

La emulsión obtenida se concentra (eliminando el solvente orgánico) al volumen final de 10 ml aplicando calor 37°C y vacío.

Las nanocápsulas resultantes de esa preparación presentaron tamaño nanométrico (inferior a 1 micra, más concretamente entre 200-600 nm), potencial zeta positivo (+25mV- +60mV), una eficacia de encapsulación del valerato de betametasona del 99,9% (esto fue cuantificado indirectamente tras la cuantificación en la fase acuosa externa). Más concretamente las características físico-química y eficacia de encapsulación de las nanocápsulas se describen en la Tabla VI.

Tabla VI:

Características físico-químicas y eficacia de encapsulación de las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona (Media $\pm$ DE).

Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficacia de Encapsulación (%)
348 $\pm$ 71	+ 46.9 $\pm$ 1.3	99,94 $\pm$ 0,01

Ejemplo 5

Estudio de estabilidad de las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona en suspensión a temperatura ambiente

Las nanocápsulas preparadas como se indica en el ejemplo 4, fueron sometidas a un estudio de estabilidad, en el cual se almacenaron a temperatura ambiente durante 6 meses, midiendo el tamaño de partícula, el potencial zeta y

la presencia del valerato de Betametasona en la fase acuosa. Como aparece reflejado en la Tabla VII mantienen el tamaño nanométrico, el potencial zeta positivo, y el valerato de Betametasona permanece en los núcleos lipídicos de las nanocápsulas.

- 5 Tabla VII:
Características de las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona almacenadas a temperatura ambiente (Media $\pm$ DE).

tiempo a T° Ambiente (meses)	tamaño (nm)	potencial zeta (mV)	concentración en fase acuosa externa
0	383 $\pm$ 41	+ 46.9 $\pm$ 1.3	< 5 μ g/ml (0,6 μ g/ml)
6	413 $\pm$ 10	+ 48.2 $\pm$ 2,6	< 5 μ g/ml (0,9 μ g/ml)

- 10 Ejemplo 6
Estudio de estabilidad de las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona en suspensión a 37°C

- 15 Las nanocápsulas preparadas como se indica en el ejemplo 4, fueron sometidas a un estudio de estabilidad, en el cual se almacenaron a 37°C durante 6 meses, midiendo el tamaño de partícula, el potencial zeta y la presencia del valerato de Betametasona en la fase acuosa. Las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona son estables.

- 20 Tabla VIII:
Características de las nanocápsulas de quitosano con Valerato de Betametasona almacenadas a 37°C (Media $\pm$ DE).

tiempo a 37°C (meses)	tamaño (nm)	potencial zeta (mV)	concentración en fase acuosa externa
0	383 $\pm$ 41	+ 46,9 $\pm$ 1,3	< 5 μ g/ml (0,6 μ g/ml)
6	465 $\pm$ 14	+ 58,4 $\pm$ 1,8	< 5 μ g/ml (1,5 μ g/ml)

REIVINDICACIONES

- 1) Un sistema que comprende nanocápsulas con un tamaño medio inferior a 1 μm dispersas en un medio acuoso, donde las nanocápsulas tienen una estructura que comprende:
 - a. una fase lipofílica que comprende:
 - 5 a.1) al menos, un componente fosfolipídico; y
 - a.2) un aceite que comprende uno o más ácidos grasos de cadena C_{12} - C_{24} saturados y/o insaturados o derivados de los mismos;
 - b. una fase hidrofílica que comprende:
 - 10 b.1) quitosano o un derivado del mismo; y
 - 10 b.2) un compuesto polioxialquilenado.
- 2) Sistema según la reivindicación 1 en el que el componente fosfolipídico comprende fosfoglicéridos, preferentemente seleccionados entre fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, ácido fosfatídico y mezclas de los mismos.
- 3) Sistema según la reivindicación 2 en el que el componente fosfolipídico comprende lecitina, preferentemente lecitina de soja.
- 4) Sistema según la reivindicación 3 en el que la lecitina tiene una proporción de fosfatidilcolina entre 35% y 75% en peso, preferentemente entre 35% y 55%.
- 5) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el aceite comprende aceite de ricino.
- 6) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el compuesto polioxialquilenado es un polioxietileno o un copolímero de óxido de etileno-óxido de propileno.
- 7) Sistema según la reivindicación 6 donde el compuesto polioxietileno comprende un poloxámero, preferentemente poloxamer 188.
- 8) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que la proporción de componente fosfolipídico en el sistema está entre 0.1% y 10% en peso con respecto al peso total incluyendo el agua, preferentemente entre 0.5% y 5%, más preferentemente entre 1% y 2.5% en peso.
- 9) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que la proporción de aceite en el sistema está entre 1% y 20% en peso con respecto al peso total incluyendo el agua, preferentemente entre 2.5% y 10%, más preferentemente entre 4.5% y 5.5% en peso.
- 10) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que la proporción de quitosano en el sistema está entre 0.05% y 10% en peso con respecto al peso total incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1% y 2%, más preferentemente entre 0.25% y 1% en peso.
- 11) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que la proporción del compuesto polioxialquilenado en el sistema está comprendida entre 0.05% y 10% en peso con respecto al peso total incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1% y 5%, más preferentemente entre 1% y 2.5%.
- 12) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el medio acuoso además comprende un polímero hidrofílico viscosizante.
- 13) Sistema según la reivindicación 12 en el que el polímero viscosizante se selecciona entre polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, quitosano, poloxámeros, polietilenglicol, y mezclas de los mismos.
- 14) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, el que además comprende ácido hialurónico o cualquiera de sus sales.
- 15) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que las nanocápsulas tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 50 y 800 nm, más preferentemente entre 200 y 700 nm.
- 16) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que las nanocápsulas tienen una carga superficial positiva, preferentemente representada por un potencial zeta comprendido entre +1mV y +70 mV.
- 17) Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que además comprende una molécula lipofílica biológicamente activa en la fase lipofílica de la nanocápsula seleccionada del grupo que consiste en proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos lipofilizados, corticosteroides, vitaminas lipofílicas, como A, D, K y E, agentes antifúngicos, agentes bacteriostáticos, agentes cicatrizantes, agentes antihistamínicos, agentes anestésicos, agentes antipruriginosos, agentes antipsoriásicos, agentes antibióticos, agentes antivirales, agentes antisépticos, agentes antiacnéicos, agentes despigmentantes, agentes antiseborreicos, agentes inmunosupresores, agentes anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) y agentes antiinflamatorios derivados del Capsicum.

- 18) Sistema según la reivindicación 17 en el que la molécula lipofílica es ciclosporina.
- 19) Sistema según la reivindicación 17 donde la molécula lipofílica es hidrocortisona, prednisona, fluticasona, prednisolona, triamcinolona, triamcinolona acetónida, dexametasona, betametasona, valerato de betametasona, beclometasona, beclometasona dipropionato, preferentemente valerato de betametasona.
- 5 20) Composición farmacéutica que comprende un sistema tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y una molécula biológicamente activa capaz de prevenir, aliviar o curar enfermedades.
- 21) Composición según la reivindicación 20, para administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal o vaginal.
- 10 22) Composición cosmética que comprende un sistema como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
- 23) Composición según la reivindicación 22 que comprende una molécula lipofílica cosméticamente aceptable que se selecciona de entre agentes emolientes, conservantes, sustancias aromatizantes, agentes anti-acné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes anticaspa, despigmentantes, agentes antiseborreicos, colorantes, bronceadores, absorbentes de luz UV, enzimas y sustancias aromatizantes.
- 15 24) Procedimiento para la preparación de un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 que comprende:
- a) preparación de la fase lipofílica mediante la disolución en un disolvente orgánico del componente fosfolipídico y del aceite, y opcionalmente una molécula lipofílica como ingrediente activo;
- 20 b) preparación de la fase hidrofílica mediante la disolución en agua del quitosano y el compuesto polioxialquilenado;
- c) calentamiento de ambas fases a una temperatura comprendida entre 40 y 60°C;
- d) mezclado de las fases lipofílica e hidrofílica bajo agitación con formación espontánea de las nanocápsulas; y
- e) eliminación del disolvente orgánico.