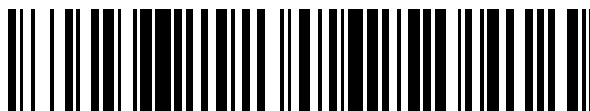


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 264**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2010** **E 10711328 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 2405896**

54 Título: **Glicerosomas y uso de estos en preparaciones farmacéuticas y cosméticas para aplicación tópica**

30 Prioridad:

**10.03.2009 IT MI20090350**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.07.2014**

73 Titular/es:

**PRIGEN S.R.L. (100.0%)**  
**Via Anita Garibaldi 1**  
**20052 Monza (MI), IT**

72 Inventor/es:

**ZARU, MARCO;**  
**MANCA, MARIA LETIZIA;**  
**FADDA, ANNA MARIA y**  
**ORSINI, GAETANO**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

ES 2 478 264 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

Glicerosomas y uso de estos en preparaciones farmacéuticas y cosméticas para aplicación tópica

5 La presente invención se refiere a nanoestructuras vesiculares útiles para la formulación de ingredientes farmacéuticos activos y productos cosméticos y para su aplicación para la entrega tópica de fármacos y cosméticos. Las nanoestructuras vesiculares descritas en la presente invención se nombran glicerosomas debido a su alto contenido de glicerina.

Antecedentes de la invención.

10 La entrega tópica de fármacos, en comparación con las rutas convencionales de administración tales como la entrega oral o parenteral, es así potencialmente ventajosa ya que evita la degradación del principio activo en el tracto gastrointestinal y el metabolismo hepático de primer paso y es más aceptable por los pacientes.

15 Sin embargo la piel, que consiste en dos capas, la más profunda o dermis y la capa externa o epidermis, se comporta como una barrera difícil de permear para la mayoría de las sustancias farmacológicas.

20 La capa más profunda o dermis, cuyo espesor está entre 0.3 y 4 mm, consiste en tejido conectivo incrustado con los vasos sanguíneos, unidades-pilo sebáceas (folículos pilosos y glándulas sebáceas), así como las terminaciones nerviosas que hace de la piel un verdadero órgano de los sentidos. A nivel de la dermis, los principios activos pueden atravesar las paredes de los capilares para entrar en el sistema circulatorio y llegar a diferentes tejidos. La capa más externa de la piel o epidermis, cuyo espesor está entre 50 y 150 µm, está cubierto por una película hidrolipídica y realiza una función de barrera contra los microorganismos y otras moléculas exógenas del ambiente circundante. Los queratinocitos son las células de la epidermis típicas que se originan en la capa más interna cerca de la dermis y se someten a un proceso de diferenciación gradual llamado queratinización que termina con la migración a la superficie para formar una capa córnea de células muertas (estrato córneo) con espesor entre 10 y 30 µm.

30 La capa córnea actúa como una barrera efectiva que limita el paso de principios activos cuya tasa de absorción transdérmica se correlaciona con la generalmente muy baja tasa de su penetración a través de la capa córnea. Debido a este efecto de barrera, la administración tópica de fármacos normalmente resulta en una biodisponibilidad reducida.

35 Diferentes enfoques han sido investigados para mejorar la difusión de fármacos a través de la piel que incluyen métodos físico-químicos basados en el uso de potenciadores de la penetración tales como dimetilsulfóxido, ácidos grasos, propilenglicol y urea [Williams CA e Barry BW, 1992], igualmente métodos físicos, que incluyen, entre otros, la iontoforesis, electroporación y ultrasonido de baja frecuencia [Lavon I e J Kost, 2004] o una aplicación combinada de ambos métodos físicos y potenciadores químicos.

40 Un enfoque diferente para mejorar la difusión transdérmica de fármacos se basa en las propiedades de soporte de estructuras vesiculares generalmente indicadas como liposomas. Los liposomas son vesículas microscópicas de 50-500 nm que contienen fosfolípidos anfipáticos que son moléculas que tienen una cabeza polar y una cola lipídica. En ambiente acuoso las cabezas hidrófilas se alinean para formar una superficie orientada hacia el agua mientras que las colas hidrofóbicas, repelidas por el agua, se alinean para formar una superficie lejos del agua; por otra parte, las colas hidrofóbicas de una capa interactúan con las colas hidrofóbicas de otra capa para formar estructuras bicapas cerradas organizadas como vesículas unilamelar o multilamelar que contienen uno o más compartimentos acuosos.

45 Las propiedades físico-químicas de los liposomas se pueden modificar fácilmente por las variaciones de los métodos de preparación y/o mediante la inclusión de sustancias diferentes en su composición tales como, por ejemplo, el colesterol que aumenta la estabilidad de la bicapa lipídica, o moléculas de lípidos ácidos o básicos que modifican la carga eléctrica de superficies vesiculares y reducen la agregación de liposomas. Los compuestos hidrófilos se solubilizan en compartimentos acuosos de liposomas y los compuestos hidrofóbicos entran en las bicapas lipídicas mientras que las moléculas anfipáticas se distribuyen con sus porciones polares en agua y las porciones apolares en lamelas lipídica

50 Por otra parte, los ingredientes usados para preparar liposomas son seguros, no alergénicos y al ser totalmente compatibles con las membranas biológicas permiten la interacción de los liposomas con las células.

55 Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar la interacción entre los liposomas y las células y algunos de ellos posiblemente pueden ocurrir juntos. El mecanismo más plausible es la endocitosis, donde los liposomas intactos se fagocitan por las células y se internalizan en los lisosomas donde los fármacos son liberados por la degradación de la fosfolipasa de las bicapas lipídicas. Otros posibles mecanismos se basan en el intercambio de sustancia lipídica debido a la fusión de las bicapas de liposomas con las membranas celulares seguido de la distribución de contenido de la vesícula entre el compartimento citoplasmático y las membranas celulares en dependencia de sus propiedades fisicoquímicas.

El uso de liposomas para la entrega de fármacos dirigida a nivel de la dermis y la epidermis con el objetivo de reducir la absorción sistémica y los efectos no deseados se ha sugerido por primera vez en 1980 [Mezei M e Gulasekhar V, 1980; Mezei M, 1988] y luego estudiado por muchos autores [Lichtenberg D e Barenholz Y, 1988; Woodle MC e Papahadjopoulos D, 1989, Sinico C y otros. 2005, Manconi M y otros 2006]. En algunos casos, los liposomas pueden ser usados para la permeación transdérmica de fármacos o agentes cosméticos a través de apéndices de la piel, tales como los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, ya que, a este nivel, en dependencia de la composición de liposomas y la técnica de preparación, los principios activos pueden atravesar las paredes de los capilares y llegar a los diferentes tejidos y órganos desde la circulación sanguínea [El Maghraby G. M y otros, 2006]. En la mayoría de los casos, sin embargo, el uso de liposomas como vehículos para la administración tópica y/o transdérmica de principios activos es de poco o ningún valor puesto que los liposomas convencionales no penetran la piel sino que más bien permanecen confinados a las capas superiores del estrato córneo. Más tarde, nuevas clases de vesículas lipídicas se han desarrollado, particularmente vesículas lipídicas deformables y etosomas, donde la presencia de aditivos específicos modifican las propiedades físico-químicas y funcionales de los liposomas convencionales que permiten una entrega más eficiente de los fármacos a las capas más profundas de la piel.

Los liposomas deformables o flexibles (también llamados Transferomes®) incorporan, además del componente de fosfolípidos basales, surfactantes de cadena sencilla con un radio de curvatura alto (seleccionado, por ejemplo, entre colato de sodio, desoxicolato de sodio, glicirricinato de potasio, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80) que son capaces de desestabilizar las bicapas lipídicas de las vesículas y aumentar la deformabilidad de los liposomas lo que proporciona una capacidad de penetración en la piel más alta [Cevc G, Blume G, 1992].

Los transferosomas son morfológicamente similares a los liposomas estándar incluso si son funcionalmente diferentes al ser suficientemente deformables y flexibles para penetrar en los poros mucho más pequeños que su propio tamaño. El mecanismo de acción de los transferosomas se basa tanto en una mejor capacidad de vesículas intactas deformables para entrar en el estrato córneo como en la posterior modificación y la desestabilización de las estructuras lipídicas intercelulares que facilitan la difusión de moléculas libres de fármacos de las vesículas.

Sin embargo, ya que los mecanismos de transporte de estas vesículas deformables podrían depender parcialmente de las propiedades físico-químicas de los fármacos incorporados, la preparación de transferosomas necesita ser optimizada caso por caso [Elsayed MMA y otros, 2006].

Un enfoque diferente para aumentar la fluidez de las membranas lipídicas de liposomas con el fin de mejorar su función como portadores de fármacos y/o productos cosméticos está representado por vesículas lipídicas llamadas etosomas compuestas de fosfolípidos, agua y altas concentraciones, generalmente entre 20% y 50%, de etanol [Touitou E, patente de los Estados Unidos 5,716,638]. Las altas concentraciones de etanol reducen el tamaño de los etosomas y, generalmente, aumentan su eficiencia de encapsulación para una amplia gama de principios activos, que incluyen moléculas lipofílicas lo que resulta en un sistema de entrega efectiva para la administración tópica de fármacos [Touitou E y otros, 2000].

La acción de los etosomas es posiblemente debido a un mecanismo sinérgico entre el etanol, las vesículas lipídicas y lípidos de la piel donde la presencia de etanol podría proporcionar las vesículas con características flexibles para una mejor penetración en las capas más profundas de la piel, así como mostrar su bien conocido efecto potenciador de la permeación [Williams A, 2003].

Además, los etosomas que penetran en las capas profundas de la piel podrían fusionarse con lípidos de la piel que promueven la liberación de fármacos a nivel de la dermis y, posiblemente, su absorción transdérmica.

Sin embargo, debido al alto contenido de etanol, el uso de etosomas como sistema de entrega para fármacos y/o productos cosméticos puede tener efectos desfavorables o irritantes en caso de aplicación sobre la piel herida o de cualquier otra forma lesionada.

US6348215 describe una preparación de liposoma que contiene taxano estable que comprende un liposoma que contiene uno o más taxanos presentes en el liposoma en una cantidad de menos de 20% en mol del taxano total del liposoma, en donde el liposoma se suspende en una composición glicerina:agua que tiene al menos glicerina al 30%, y un método de estabilizar un taxano en un sistema disperso que usa esta formulación.

## Descripción de la invención

Durante el desarrollo de formulaciones tipo liposomas, los inventores han encontrado sorprendentemente nuevas estructuras de vesículas con mejores características de portadores para su uso en los campos farmacéutico y cosmético. Estas nuevas formulaciones, llamados glicerosomas, están compuestos por fosfolípidos y agua y se caracterizan por contener una alta cantidad de glicerina (de 20 a 35%), que, a diferencia del etanol contenido en los etosomas, es un compuesto inocuo y totalmente aceptado para aplicaciones tópicas. Además, a diferencia de los liposomas conocidos en la técnica [como por ejemplo en Fukui M, EP 1013268; Guilford FT, US 2006/0099244 y en Leigh S, WO 92/18103], los glicerosomas de la presente invención se caracterizan específicamente por estar preparados en ausencia de etanol con el fin de evitar su acción irritante seguido la aplicación tópica.

Los glicerosomas de acuerdo con la invención, cuyo contenido de glicerina es entre 20% y 35% p/p, se puede preparar de cualquiera de los fosfolípidos naturales o sintéticos comúnmente usados en la preparación de liposomas convencionales conocidos en la técnica; de manera similar, los glicerosomas pueden contener uno o más aditivos usados comúnmente en la preparación de liposomas convencionales conocidos en la técnica y pueden ser obtenidos por cualquiera de las diferentes técnicas comúnmente usadas para la preparación de liposomas convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en las siguientes publicaciones y patentes que se incorporan en la presente como referencia: Vemuri S, Rhodes CT. 1995; Cevc G.2004; Torchilin VP, Weissig V, 2003.

En una modalidad adicional de la invención, los glicerosomas pueden usarse como portadores de principios activos e incorporados en formulaciones para aplicaciones tópicas conocidas en la técnica que comprende, pero sin limitarse a, cremas, emulsiones, ungüentos, geles, lociones, suspensiones y formulaciones equivalentes.

Los ejemplos de composiciones de glicerosomas de acuerdo con la presente invención se presentan en la tabla 1 siguiente:

| Fosfolípidos | Glicerina | Modificadores | Mejoradores de absorción | Principios activos | Conservantes | Agua   |
|--------------|-----------|---------------|--------------------------|--------------------|--------------|--------|
| 1-10%        | 20-35%    | 0-2%          | 0-5%                     | 0-20%              | 0-1%         | a 100% |

Los componentes de fosfolípidos consisten en uno o más fosfolípidos extraídos por fuentes naturales o de fosfolípidos preparados por métodos sintéticos o semi-sintéticos tales como, por ejemplo, fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), distearoil fosfatidilcolina, palmitoil-estearoil fosfatidilcolina, esfingomielina, mezclas de fosfolípidos no hidrogenados e hidrogenados derivados de frijol de soya tales como Phospholipon 90 (p90), Phospholipon 100 (p100), Phospholipon 90G (p90G), Phospholipon 90H (p90H) así como también mezclas similares. Las propiedades más relevantes que los fosfolípidos deben poseer para ser usados en la preparación de glicerosomas de acuerdo con la invención son (i) capacidad para dar vesículas que son capaces de incorporar los principios activos, (ii) la compatibilidad biológica, (iii) degradación metabólica y (iv) falta de toxicidad.

Los componentes modificadores, añadidos a los glicerosomas como estabilizantes y/o para modificar su carga eléctrica pueden seleccionarse de colesterol, estearilamina y dicetilfosfato.

Los potenciadores de la absorción se pueden seleccionar de dimetilsulfóxido, propilenglicol y ácidos grasos.

Los glicerosomas de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con diferentes enfoques conocidos en la técnica para la preparación de liposomas convencionales que incluyen, por ejemplo, el método de hidratación de película lipídica descrito por primera vez por Bangham y otros (1965) así como los métodos basados en los mismos principios [Kirby C e Gregoriadis G, 1984]; las técnicas de evaporación de fase reversa [Skoza F, Papahadjopoulos D, 1980; Papahadjopoulos D y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,235,871; Pick U, 1981]; el método de evaporación supercrítica de fase reversa [Imura T y otros, 2002].

En dependencia de la composición y método de preparación, los glicerosomas de la presente invención pueden resultar en vesículas lipídicas unilamelares (pequeñas o grandes) o en vesículas lipídicas multilamelares. Los glicerosomas en forma de vesículas multilamelares se pueden convertir en vesículas unilamelares mediante sonicación u homogeneización, por extrusión o por filtración a través de membranas con un tamaño de poro específico.

Cabe señalar que los glicerosomas que contienen más de 20% p/p de glicerina son más efectivos que los que tienen menos glicerina (por ejemplo de 10 a 15%) en varios aspectos:

- a) Una concentración de glicerina más alta (> 20%) mejora las propiedades reológicas (por ejemplo, viscosidad) y, en consecuencia, da una contribución positiva a la estabilización del sistema vesicular del glicerosoma.

b) Una concentración de glicerina inferior al 20% dificulta el ensamblaje de vesículas a temperatura ambiente (particularmente, a 25°C) cuando fosfolípidos con temperaturas de transición alta (por ejemplo 70-80°C) se usan para la preparación de glicerosomas.

c) Las vesículas preparadas con una concentración de glicerina baja (10-15%) muestran una flexibilidad reducida y posiblemente una capacidad de penetración en la piel reducida.

Los glicerosomas de la presente invención se pueden usar como portadores para suministrar principios activos de interés farmacéutico o cosmético, incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos lipofílicos tales como aciclovir, ácido trans-retinoico, dipropionato de betametasona, lidocaina, minoxidil, anfotericina B, gentamicina, rifampicina, vitamin E y ésteres o derivados lipofílicos de vitamina E, etc. así como también compuestos hidrófilos tales como, por ejemplo, diclofenaco sódico, lidocaína clorhidrato, ácido hialurónico, vitamina C y sus derivados, derivados solubles de vitamina E como TPGS de Vitamina E, etc.

Para ilustrar más aún la presente invención, sin limitar el campo de aplicación de la misma, hemos comparado las características físico-químicas y funcionales de glicerosomas con liposomas convencionales - tanto preparado como se describe en el Ejemplo 1 - como portadores para fármaco antiviral aciclovir, para el compuesto esteroideo sintético altamente lipófilo dipropionato de betametasona y para el polietilenglicol de d-alfa-tocoferilo glicol- succinato 1000 (Vitamina E TPGS o Tocophersolan) que es una forma soluble en agua de la vitamina E natural usada en el campo farmacéutico y como antioxidante en las preparaciones cosméticas.

El aciclovir es un análogo de nucleósido de purina acíclico usado para el tratamiento tópico de las lesiones orofaciales recurrentes, particularmente en casos de herpes labial, que son causadas por infecciones del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1); una formulación de aciclovir para el tratamiento tópico está comercialmente disponible como una crema que contiene 5% de principio activo bajo la marca Zovirax.

Como se muestra en la Tabla 2, las vesículas portadoras que contiene el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y el colesterol agente modificador se cargaron con dos concentraciones de principio activo, principalmente, aciclovir al 5% en las preparaciones A y aciclovir al 1% en las preparaciones B.

Tabla 2. Porcentaje de la composición de glicerosomas y liposomas cargados con aciclovir.

|                  | DPPC | Colesterol | Aciclovir | Glicerina |
|------------------|------|------------|-----------|-----------|
| Glicerosomas -A  | 3    | 0.1        | 5         | 25        |
| Glicerosomas - B | 3    | 0.1        | 1         | 25        |
| Liposomas - A    | 3    | 0.1        | 5         | -         |
| Liposomas - B    | 3    | 0.1        | 1         | -         |

La eficiencia de atrapamiento del principio activo se calcula teniendo en cuenta la cantidad no incorporado y separada durante la purificación de glicerosomas en una columna de filtración en gel. De hecho, se mide la cantidad de principio activo incorporado en preparaciones de glicerosomas purificados después de la interrupción de vesículas purificadas por la acción de Triton-X100 o metanol. La eficiencia de incorporación (% E) se expresa como porcentaje de principio activo absorbido por las vesículas con respecto a la cantidad de carga inicial, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% E = \text{cantidad de principio activo de la preparación purificada} \times 100 / \text{carga inicial de principio activo}$$

Los glicerosomas mostraron una significativamente mayor eficacia de incorporación de aciclovir con respecto a la incorporación en liposomas convencionales, como se informa en la Tabla 3.

Tabla 3. Eficacia de la incorporación de aciclovir en glicerosomas y liposomas.

| Eficacia de la incorporación de aciclovir (%) |             |
|-----------------------------------------------|-------------|
| Glicerosomas-A                                | Liposomas-A |
| 54.4 ± 8                                      | 30.6 ± 5    |

Una ventaja adicional de los glicerosomas está representado por el hecho de que se preparan a temperatura ambiente, con mayor preferencia a temperatura inferior a 30°C o, en una modalidad preferida a 25°C, con independencia del tipo de fosfolípido usado para la preparación; por el contrario la temperatura operativa para la preparación de liposomas convencionales se corresponde con o es mayor que la temperatura de transición (Tc) de los componentes de fosfolípidos que, en algunos casos, puede estar en el intervalo de 60-80°C, como por ejemplo con DPPC con una Tc = 70°C. Evitar

cualquier calentamiento de las mezclas de preparación de los glicerosomas representa una ventaja obvia cuando el principio activo incorporado es termolábil o puede descomponerse parcialmente al calentarse.

Los análisis morfológicos de glicerosomas cargados de aciclovir por microscopía óptica con luz polarizada permitieron la identificación de las cruces de malta, que confirman la presencia de sistemas lamelares asimilables a estructuras vesiculares [Manosroi A y otros, 2003; Mele S y otros, 2003; Sinico C y otros 2005]. La presencia de estructuras vesiculares lamelares se confirmó por el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de preparaciones de glicerosomas, como se muestra en la figura 1.

La estabilidad de las preparaciones se estudió por análisis dimensional de acuerdo con la técnica de espectroscopia de correlación de fotones, por determinación del potencial Z, por dispersión de luz láser dinámica y por medición del índice de polidispersidad en varios tiempos (hasta 3 semanas) a continuación de la preparación de las vesículas.

El tamaño medio de glicerosomas y liposomas (como se calcula en triple en tres preparaciones diferentes) fueron, respectivamente, alrededor de 100 nm y 150 nm, mientras que el cálculo del índice de polidispersidad (PI), que representa un parámetro importante para evaluar la homogeneidad de las preparaciones vesiculares, demostró mayor homogeneidad para glicerosomas con valores medios PI de 0.2 en comparación con el valor promedio de PI de 0.4 para los liposomas, como se muestra en la figura 2. La mejor homogeneidad de glicerosomas es una propiedad particularmente útil para su uso en sistemas de entrega de interés farmacéutico y cosmético.

Además, el alto contenido de glicerina resultó en una mayor flexibilidad de los glicerosomas en comparación con los liposomas convencionales, como se demostró mediante la medición del tamaño medio de partícula y el índice de polidispersidad antes y después de la extrusión de las preparaciones a través de filtros de tamaño de poro de 50 nm, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Prueba de Extrusión de glicerosomas cargados de aciclovir al 5% y liposomas en filtros de tamaño de poro 50 nm.

|                        | Antes de la extrusión |      | Después de la extrusión |      |
|------------------------|-----------------------|------|-------------------------|------|
|                        | Tamaño nm $\pm$ DE    | PI   | Tamaño nm $\pm$ DE      | PI   |
| <b>Glicerosomas -A</b> | 108 $\pm$ 33          | 0.23 | 105 $\pm$ 24            | 0.27 |
| <b>Liposomas-A</b>     | 148 $\pm$ 28          | 0.45 | 98 $\pm$ 21             | 0.63 |

Los resultados de la tabla 4 muestran claramente la mayor rigidez de los liposomas convencionales que después de la extrusión mostraron una reducción del tamaño significativa mientras que el índice de polidispersidad aumentó debido al hecho de que sólo las vesículas cuyo tamaño fue comparable a la porosidad de la membrana se filtraron intactas mientras que las vesículas más grandes se dañaron y se desestabilizaron parcialmente.

La flexibilidad de los glicerosomas superior representa una propiedad aún más útil para su aplicación como portadores para la entrega tópica de fármacos ya que el uso de vesículas más flexibles puede potenciar la penetración y el transporte de los principios activos en las capas profundas de la piel [Cevc G, Gebauer D., 2003].

La absorción transdérmica de glicerosomas cargados de aciclovir al 5% y liposomas, que es la liberación y la permeación del principio activo a través de la piel, se evaluó en una celda de Franz vertical, que es un enfoque experimental adecuado para estudiar la absorción percutánea de formulaciones tópicas usando una membrana de la piel de cerdo recién nacido. Como se describe en el ejemplo 6, la celda se mantuvo en un baño termostático a la temperatura fisiológica de la piel de 32°C hasta 24 horas; en el extremo de la muestra de la piel porcina del experimento usada en la celda de Franz como membranas se seccionaron manualmente y se analizaron por separado el estrato córneo, la epidermis y la dermis para medir la distribución de principio activo en diferentes capas de la piel.

En estos experimentos, los glicerosomas cargados de aciclovir al 5% y liposomas se compararon con una crema aciclovir disponible comercialmente para aplicaciones tópicas (Zovirax®, crema de aciclovir al 5%) y los resultados en términos de permeación de aciclovir dependiente de tiempo y la distribución de aciclovir en diferentes capas de la piel se muestran respectivamente en la figura 3 y la tabla 5.

De acuerdo con los resultados de la figura 3, los glicerosomas cargados de aciclovir al 5% -B que contienen glicerina al 25% mostraron un flujo de permeación in vitro mayor (medido como aciclovir /cm<sup>2</sup> de piel) en comparación tanto con las formulaciones de liposomas convencionales como la crema de aciclovir al 5% comercial. Particularmente, la permeación de aciclovir en 24 horas a partir glicerosomas fue aproximadamente 4 veces mayor que la permeación de la formulación de la crema comercial. Los resultados de la figura 3, que muestran que los glicerosomas cargados de aciclovir al 1% -B dieron un

flujo total de permeación todavía 2 veces más alto en comparación con la formulación de crema comercial se puede considerar una ventaja potencial en términos de seguridad que permite utilizar dosis más bajas y desde el punto de vista económico/ productivo que permite reducir la cantidad de principio activo.

- 5 La distribución de aciclovir entre los diferentes compartimentos cutáneos después de la permeación de 24 horas, como se muestra en la tabla 5, demuestran mayor acumulación de la epidermis en el caso de formulaciones vesiculares mientras que en el caso de la crema comercial la mayor cantidad de principio activo se confinó en el estrato córneo. Incluso si la acumulación a nivel de la dermis y la epidermis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes formulaciones, los resultados de la tabla 5 confirman las diferencias en las velocidades de flujo y refuerzan la capacidad de
- 10 potenciador de la penetración de los glicerosomas.

Tabla 5 La acumulación en diferentes capas de la piel a partir de glicerosomas cargados de aciclovir al 5% y liposomas en comparación con una crema de aciclovir al 5% comercial (Zovirax®). Los experimentos se han realizado durante 24 horas, en una celda de Franz equipada con una membrana de difusión (0.636 cm<sup>2</sup>) a partir de piel de cerdo recién nacido.

|                       | Estrato córneo |                      | Epidermis |                      | Dermis  |                      |
|-----------------------|----------------|----------------------|-----------|----------------------|---------|----------------------|
|                       | µg/g           | Dosis adsorbida en % | µg/g      | Dosis adsorbida en % | µg/g    | Dosis adsorbida en % |
| <b>Glicerosomas-A</b> | 67 ± 4         | 0.27 ± 0.002         | 227 ± 13  | 0.91 ± 0.05          | 67 ± 4  | 0.27 ± 0.03          |
| <b>Liposomas-A</b>    | 76 ± 9         | 0.30 ± 0.003         | 178 ± 35  | 0.71 ± 0.14          | 44 ± 13 | 0.18 ± 0.05          |
| <b>Zovirax</b>        | 527 ± 35       | 2.10 ± 0.140         | 183 ± 71  | 0.73 ± 0.28          | 80 ± 17 | 0.32 ± 0.07          |

- 15 El dipropionato de betametasona es un corticosteroide sintético lipofílico que como formulaciones de ungüento, loción o crema se utiliza para el tratamiento tópico de dermatitis de respuesta a corticosteroides debido a los efectos vasoconstrictores, antiinflamatorios y anti-picor local.

- 20 La eficiencia de incorporación de dipropionato de betametasona es mayor para glicerosomas que para los liposomas convencionales que mostraron un valor de índice de incorporación de % E de 68% y 42% respectivamente.

- 25 La distribución en los diferentes compartimientos cutáneos de glicerosomas cargados al 0.2% -A que contienen glicerina al 25% y liposomas convencionales se estudiaron en experimentos de difusión de 24 horas mediante el uso de piel de cerdo recién nacido en las celdas de Franz; los resultados que se muestran en la figura 4 demuestran que los glicerosomas cargados con un compuesto altamente lipofílico como dipropionato de betametasona aumentaron la acumulación del principio activo en las capas profundas de la piel.

- 30 El succinato de D-alfa-tocoferilo polietilenglicol-1000 (TPGS de Vitamina E o Tocofersolan) es un derivado soluble en agua de la vitamina E natural preparado por esterificación del grupo carboxílico libre del succinato de vitamina E con polietilenglicol de 1,000 Dalton. El TPGS de Vitamina E puede entrar en formulaciones farmacéuticas como emulsionante, surfactante y mejorador de la absorción y se puede usar en formulaciones de cosméticos y productos de cuidado de la piel debido a sus propiedades antioxidantes.

- 35 Debido a sus propiedades anfífilas, TPGS de Vitamina E está atrapado en las bicapas lipídicas de los liposomas.

- 40 En la difusión in vitro de glicerosomas cargados de TPGS de Vitamina E al 10%-A que contiene glicerina al 25% y liposomas convencionales se estudió en las celdas de Franz equipadas con membranas de separación de la piel de cerdo recién nacido y los resultados se muestran en la figura 5. Ambas formulaciones dieron perfiles de permeación que indican un mecanismo de liberación controlada como se demuestra por la baja cantidad de permeados en 24 horas (10-12 miligramos correspondientes a aproximadamente 5% de producto cargado inicialmente) y por el hecho de que, en las mismas condiciones experimentales, 20-22% de TPGS de Vitamina E permeó de una solución acuosa en un rotura pronunciada dentro de las primeras 4 horas (figura 5).

- 45 En los mismos experimentos, el análisis del contenido de Vitamina E TPGS en diferentes compartimientos de la piel, como se muestra en la tabla 6, mostró una acumulación mayor en las capas profundas de la piel (epidermis /dermis profundas) a partir de glicerosomas cargados de TPGS de Vitamina E al 10% con respecto tanto a liposomas convencionales como solución de agua.

- 50 Tabla 6 Acumulación de TPGS de Vitamina E en capas de piel profundas (epidermis/dermis profunda)

| Formulaciones      | TPGS de Vitamina E mg/gr tejido de piel |
|--------------------|-----------------------------------------|
| Soluciones de agua | 1.05 ± 0.49                             |

| Formulaciones   | TPGS de Vitamina E mg/gr tejido de piel |
|-----------------|-----------------------------------------|
| Liposomas-A     | 1.80 ± 0.42                             |
| Glicerosomas -A | 3.09 ± 0.58                             |

Las relaciones entre los perfiles de permeación y la acumulación en diferentes compartimentos de la piel demuestran que las estructuras vesiculares funcionan como un sistema de depósito de TPGS de Vitamina E; este efecto es mayor con glicerosomas cargados de TPGS de Vitamina E que dan una mayor acumulación en capas profundas de la piel y un perfil de permeación libre de rotura.

La combinación del efecto de estallido durante la permeación y de la acumulación menor de la piel observado en el caso de soluciones de agua de TPGS de Vitamina E se puede considerar como una indicación de la capacidad de permeación superior y de la probabilidad de absorción sistémica.

En conclusión, los glicerosomas de acuerdo con la presente invención, en comparación con los liposomas convencionales y otras formulaciones convencionales para la administración tópica tal como cremas, lociones, ungüento o soluciones muestran mejores perfiles de permeación que actúan como potenciadores de la penetración de la piel totalmente biocompatibles y son por tanto portadores útiles para la administración tópica administración de principios activos farmacéuticos y productos cosméticos con alta capacidad de permeación de la piel y sin riesgos de irritación cutánea.

De hecho, los glicerosomas descritos en la presente invención, se caracterizan por un contenido de glicerina entre el 20% y el 25% no contienen ningún componente agresivo, tal como alcohol etílico, que después de la aplicación tópica podría causar irritación o quemaduras en presencia de lesión cutánea como en el caso, por ejemplo, de herpes labial u otros tipos de daños de la piel.

A continuación, los ejemplos experimentales se dan con el propósito de ilustrar algunas modalidades preferidas, sin limitar el campo de aplicación de la invención.

#### Descripción de las figuras

**Figura 1:** Imagen de glicerosomas cargados de aciclovir al 5% por análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

**Figura 2:** Índice de polidispersidad (PI) de glicerosomas cargados de aciclovir al 5% -A y liposomas-A medido en varios tiempos a continuación de la preparación de vesículas.

**Figura 3:** Perfiles de permeación de glicerosomas cargados de aciclovir al 5%-A, glicerosomas-B y liposomas liposomas en comparación con una de crema de aciclovir al 5% comercial (Zovirax®). Los experimentos se han realizado durante 24 horas, en celdas de Franz equipadas con membranas de separación (0.636 cm<sup>2</sup>) de piel de cerdo recién nacido mantenidas a la temperatura fisiológica de 32°C.

**Figura 4:** Distribución de glicerosomas cargados de dipropionato de betametasona al 0.2% que contienen glicerina al 25% y liposomas convencionales, después de permeación de 24 horas en las celdas de Franz equipadas con membranas de separación (0.636 cm<sup>2</sup>) a partir de piel de cerdo recién nacido.

**Figura 5:** Perfiles de permeación de glicerosomas cargados de TPGS de Vitamina E al 10%-A que contienen glicerina al 25% y los liposomas convencionales en comparación con solución acuosa de TPGS de Vitamina E. Los experimentos se llevaron a cabo durante 24 horas en las celdas de Franz equipadas con membranas de separación (0.636 cm<sup>2</sup>) a partir de piel de cerdo recién nacido.

#### Ejemplo N° 1. Preparación de glicerosomas y liposomas

Los glicerosomas y liposomas se prepararon de acuerdo a la técnica de hidratación de película lipídica. En resumen, los componentes lipídicos ponderados (fosfolípidos, colesterol, principios activos hidrófobos o lípidos iónicos tales como estearilamina o DCP) se disolvieron en 5 ml de disolvente orgánico (cloroformo o diclorometano) usando un matraz de fondo redondo de 50 ml que contiene 5 ml de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. Se eliminó el disolvente en el evaporador rotativo al vacío a temperatura ambiente durante 2 horas para obtener en la pared del matraz una película lipídica libre de cualquier traza de disolvente. se añadieron a continuación 5 ml de solución acuosa de glicerina (concentración de glicerina entre 20% y 35%) que contiene también, si es necesario, principios activos solubles en agua y la mezcla se mantuvo bajo agitación mecánica a 10.000 rpm durante 1 hora a 25°C mediante el uso de un vástago de agitación de plástico en forma de arco en estrecho contacto con la superficie interna del matraz de fondo redondo. La emulsión, que consiste en vesículas multilamelares, se mantuvo en reposo durante 1 hora y después se homogeneizó a alta presión durante 10 minutos a 25°C mediante el uso de un homogeneizador Avestin Emulsiflex C5 fijado en 60,000-65,000 kPa. Las vesículas homogeneizadas se purificaron por filtración en gel en una columna Sephadex-G25 para separar los gliceromas, que se eluyeron en el



volumen al vacío, del principio activo no incorporado. La elución en columna se realizó con agua y las fracciones recogidas se comprobaron por análisis turbidimétrico UV a 600 nm para identificar las fracciones ricas en vesículas.

Los liposomas convencionales se prepararon como se ha descrito, excepto la realización de la hidratación de película lipídica con tampón acuoso (por ejemplo, con tampón de fosfato salino); además, tanto la hidratación y siguientes fases de homogenización se llevaron a cabo a una temperatura que corresponde a la temperatura de transición ( $T_c$ ) o superior del componente fosfolipídico (por ejemplo DPPC con  $T_c = 70^\circ\text{C}$ ; DMPC con  $T_c = 25^\circ\text{C}$ ; etc).

#### Ejemplo N° 2. Caracterización de los glicerosomas.

Las preparaciones de glicerosomas se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), microscopía óptica con luz polarizada (PLM), espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y por medición de la eficiencia de incorporación (% E).

Para la TEM, una gota de dispersión vesicular se aplicó a una rejilla de cobre, se tiñeron con solución de ácido fosfotúngstico al 1% y se examinó para confirmar la formación de vesículas, así como su morfología.

Las dimensiones de las vesículas y las mediciones de los potenciales Z se realizaron por una dispersión de luz láser dinámica (DLL), equipado con un detector de potencial Z (Malvern).

Para el cálculo de los valores de % E, correspondientes a la fracción de fármaco incorporado en vesículas con respecto a la carga inicial (100%), las vesículas cargadas se separaron del fármaco no incorporado mediante filtración en gel en una columna de Sepadex-G25 eluido con agua.

#### Ejemplo N° 3. Análisis cuantitativo de aciclovir

Las determinaciones cuantitativas de aciclovir se realizaron mediante espectrofotometría UV de acuerdo con el método descrito en la Farmacopea Británica. Brevemente, las muestras que contienen aciclovir se disolvieron completamente en ácido sulfúrico 0.5 M se extrajeron componentes lipófilos con acetato de etilo y se analizaron a una longitud de onda de 254 nm en comparación con una curva de calibración.

#### Ejemplo N° 4. Preparación de piel porcina

Se realizaron experimentos de permeación in vitro mediante el uso de espécimen de piel de cerdos recién nacidos obtenido de los mataderos locales, se extirparon inmediatamente después de la muerte de los animales, se lavaron con agua corriente, se aplanaron en láminas de aluminio y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

**[0068]** La piel de cerdo recién nacido es delgada, caracterizada por un espesor regular y libre de grasas bajo la capa dérmica.

#### Ejemplo N° 5. Ensayo de flexibilidad

La flexibilidad de las vesículas se evaluó por una prueba de extrusión que consiste en la medición de dimensiones promedio y el índice de polidispersidad antes y después de la filtración de la vesícula a través de membranas de filtración de tamaño de poro de 50 nm.

#### Ejemplo N° 6. Estudios de permeación y acumulación

Los estudios de permeación in vitro se realizaron en las celdas de difusión de Franz bajo agitación con muestras de vesículas de 500  $\mu\text{l}$  cargadas en el compartimento superior de la celda o compartimento donador. El espécimen de piel de cerdo congelado se rehidrató durante 4 horas a temperatura ambiente en tampón de fosfato de pH 7.4, se cortó en discos pequeños y se aseguró firmemente entre los dos compartimentos de la celda de Franz mediante abrazaderas metálicas. La superficie de filtración disponible de cada disco fue  $0.636\text{ cm}^2$ . En los puntos de tiempo consecutivos durante los experimentos (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 24 horas) el contenido del compartimento inferior fue completamente retirado y reemplazado con tampón fresco evitando la formación de burbujas de aire bajo la piel. Las muestras recogidas se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  en espera de la determinación del contenido de principio activo.

Al final de los experimentos, los discos de piel se secaron al aire. La capa córnea se retiró al aplicar a la piel, durante 10 segundos, una cinta adhesiva Tesafilm (tipo 40021) bajo una ligera presión y repetir el decapado después de los 40° de rotación del espécimen de piel. La dermis, separada de la epidermis con un bisturí quirúrgico, se cortó después en trozos

pequeños y se homogeneizaron en solución tampón mediante sonicación; la suspensión se filtró y el análisis cuantitativo de principio activo se realizó en la solución filtrada.

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado en tres celdas paralelas y se repitieron al menos tres veces.

## Referencias

- Bangham y otros, The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252, 1965.
- Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 226-232, 1992.
- Cevc G, Gebauer D. Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and skin barrier. *Biophys. J.* 84, 1010-1024, 2003.
- Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carrier on the skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 675-711, 2004.
- El Maghraby G.M y otros, Can drug bearing liposomes penetrate intact skin? *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 415-429, 2006.
- Elsayed MMA y otros, Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 322, 60-66, 2006.
- Fukui M. Compositions containing liposomes and/or emulsions and process for the preparation thereof. EP 1013268.
- Guilford FT. Liposomal formulation for oral administration of glutathione (reduced). la patente de Estados Unidos 2006/0099244.
- Imura T y otros. Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. *Colloids and Surface B : Biointerfaces.* 27, 133-140, 2002.
- Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles (DRV): A new method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 11, 979-984, 1984.
- Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery. *Drug Discov. Today* 9, 670-676, 2004.
- Leigh S. Method for the formation of liposomes and compositions for use therein. WO 9218193.
- Lichtenberg D, Barenholz Y. Liposomes: preparation, characterization and preservation. *Meth. Biochem. Anal.* 33, 337-461, 1988.
- Manosroi A y otros, Characterization of vesicles prepared with various non ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 30, 129-138, 2003.
- Mele S y otros, Monolein based liquid crystals to form long-term stable emulsion. *Colloids and Surface A Physicochem Eng. Aspects* 228, 57-63, 2003.
- Mezei M, Gulasekharan V. Liposomes-a selective drug delivery system for topical route of administration. 1. Lotion dosage form. *Pharm. Sci.* 82(1), 17-21, 1980.
- Mezei M. Liposomes in topical application of drugs. *Liposomes as Drugs Carriers : Recent Trends and Progress.* Wiley J. & Sons, Nueva York. Pag. 663-677, 1988.
- Papahadjopoulos D y otros Methods of encapsulating biologically active material in lipid vesicles. la patente de Estados Unidos núm. 4,235,871.
- Pick U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 186-194, 1981.
- Sinico C. y otros, Liposomal incorporation of Artemisia Arborescens L. essential oil and in vitro antiviral activity. *Pat Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 161-168, 2005.
- Sinico C y otros, Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicles skin interaction. *J. Contr. Rel* 103, 123-126, 2005.
- Manconi et.al. Niosomes as carriers for tretinoin III. A study into in vitro cutaneous delivery of vesicles-incorporated tretinoin. *Int. J. Pharm.* 311, 11-19, 2006.
- Skoza F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 467-508, 1980.
- Torchilin VP, Weissig V (editors). *Liposomes. Practical approach.* Oxford University Press, Oxford, 2003.
- Touitou E. Composition for applying active substances to or through the skin. la patente de Estados Unidos 5,716,638.
- Touitou E y otros, Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Rel.* 65, 403-418, 2000.
- Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.* 70, 95-111, 1995.
- Williams AC, Barry BW. Skin absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* 9, 305-53, 1992.
- Williams A. *Transdermal and Topical Drug Delivery*, 1st ed. Pharmaceutical Press, Londres, 2003.
- Woodle MC, Papahadjopoulos D. Liposome preparation and size characterization. *Meth. Enzymol.* 171, 193-217, 1989.

# REIVINDICACIONES

1. Vesículas tipo liposoma para aplicaciones tópicas farmacéuticas y cosméticas (glicerosomas), que comprenden:  
5           a) de 20% a 25% p/p de glicerina;  
             b) de 1% a 10% p/p de al menos un componente fosfolipídico;  
             c) al menos un principio farmacéutica o cosméticamente activo.  
  
10       y **caracterizadas porque** se preparan en ausencia de etanol.
2. Glicerosomas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho componente fosfolipídico se selecciona de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), distearoil fosfatidilcolina, palmitoil-estearoil fosfatidilcolina, esfingomielina, mezclas de fosfolípidos no hidrogenados e hidrogenados derivados de frijol de soya.
3. Glicerosomas de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, que contiene además un modificador de las membranas fosfolipídicas en concentración de 0 a 2% p/p y/o un potenciador de la absorción cutánea en una concentración de 0 a 5% p/p.
4. Glicerosomas de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde dicho modificador de las membranas fosfolipídicas se selecciona de colesterol, estearilamina, dicetilfosfato y fosfatidilglicerol (PG).
5. Glicerosomas de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde dicho potenciador de absorción cutánea se selecciona de propilenglicol, mentol y ácidos grasos.
6. Glicerosomas de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en donde el ingrediente activo farmacéutico o cosmético se selecciona de fármacos antivirales, vitaminas, extractos vegetales, fármacos antiinflamatorios, corticosteroides, antibióticos, fármacos fungicidas, fármacos antipsoriasis, aciclovir, ácido trans-retinoico, betametasona, lidocaína, minoxidil, anfotericina B, gentamicina, rifampicina, vitamina E y ésteres de estos, diclofenaco sódico, lidocaína clorhidrato, alcaloides, hidroxiaácidos, ácido hialurónico, vitamina C, TPGS de vitamina E, antioxidantes y humectantes.
7. Un proceso para la preparación de glicerosomas de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, que comprende mezclar 1-10% p/p de fosfolípidos, 20-35% p/p de glicerina, 0.1-10% p/p de principio activo, 0-2% p/p de modificador de membrana de fosfolípido; 0-5% p/p de potenciador de la absorción cutánea y agua hasta el 100% p/p, hasta que se obtiene un sistema coloidal que comprende vesículas unilamelares o multilamelares.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, el cual se lleva a cabo a una temperatura menor que 30°C.
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha temperatura es 25°C.
10. Uso de los glicerosomas de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 para la preparación de una composición farmacéutica o cosmética para administración tópica.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha composición farmacéutica o cosmética está en forma de una crema, emulsión, ungüento, gel, loción o suspensión.

**FIGURA 1**

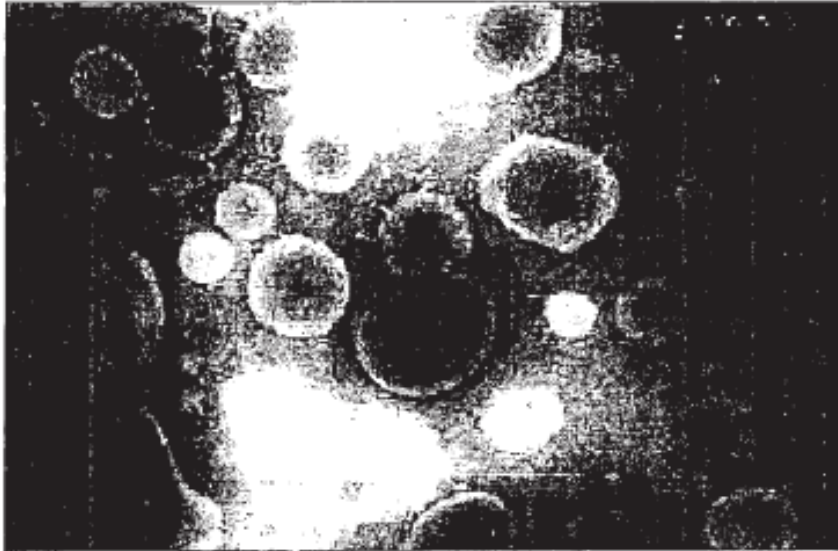


FIGURA 2

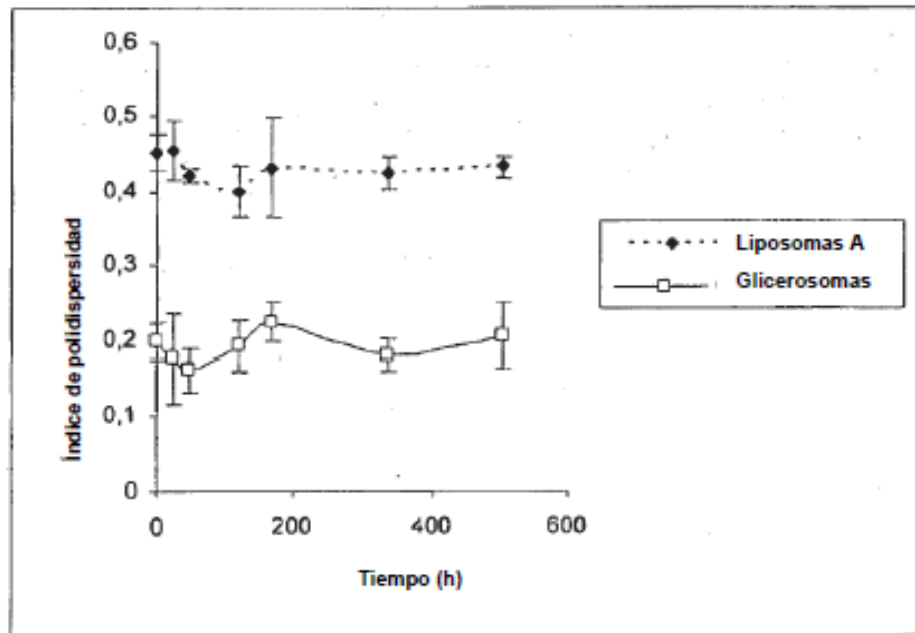


FIGURA 3

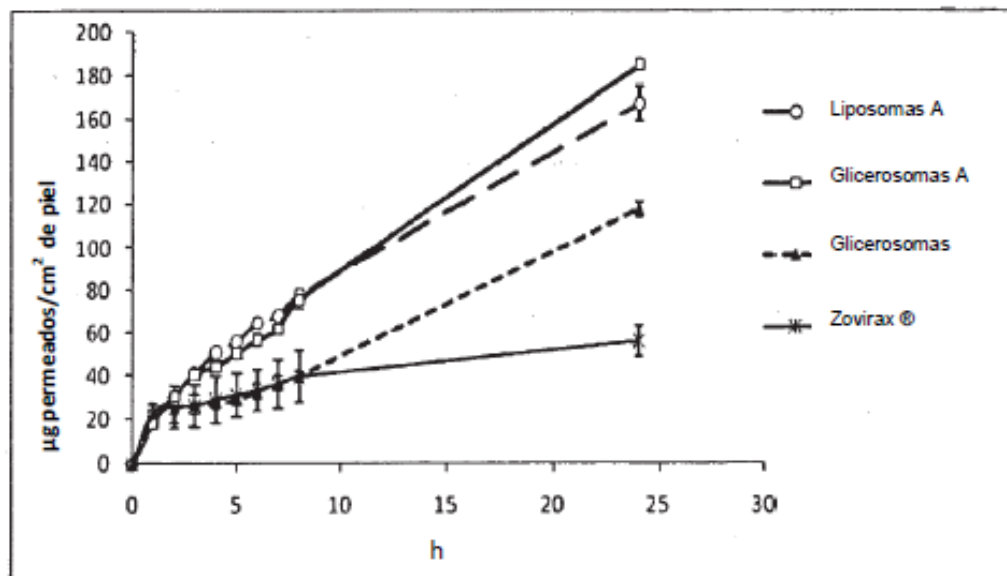


FIGURA 4

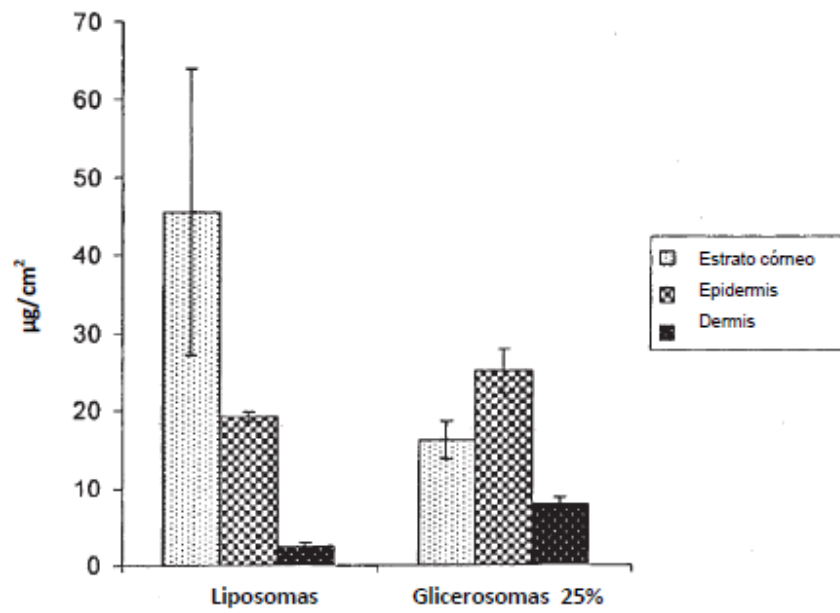


FIGURA 5

