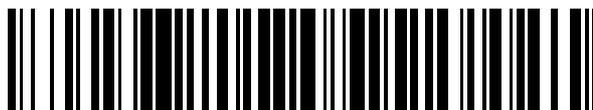


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 870**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10714072 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2413719**

54 Título: **Procedimiento de preparación de cápsulas lipídicas funcionalizadas**

30 Prioridad:

31.03.2009 FR 0952048

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

21.10.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITE D'ANGERS (50.0%)

40, rue de Rennes

49000 Angers, FR y

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)**

72 Inventor/es:

BENOIT, JEAN-PIERRE y

PERRIER, THOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 548 870 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

Procedimiento de preparación de cápsulas lipídicas funcionalizadas

5 La presente invención pretende proponer nuevos sistemas vesiculares y en particular de tipo cápsulas con envoltura lipídica sólida y núcleo lipídico líquido.

Ya se conocen unos sistemas de tipo nanocápsulas o nanogotitas cuyo tamaño varía de 50 a 500 nanómetros, y formados de un núcleo líquido o semi-sólido, cubiertos con una membrana externa.

10 Por ejemplo, la patente US 5,961,970 propone a título de vehículo de agentes activos, unas emulsiones aceite-en-agua a escala submicrónica, es decir una miniemulsiones cuyas gotitas poseen un núcleo hidrófobo de naturaleza lipídica y están estabilizadas en la superficie por unos tensioactivos anfífilos y/o no iónicos como los tensioactivos de tipo fosfolípidos. La patente US 5,576,016 describe unas macroemulsiones cuyas gotitas están formadas de un núcleo lipídico sólido y que están estabilizadas por una envoltura fosfolipídica. Los documentos EP 1 265 698, WO 15 09/001019 y FR 2 916 974, por su parte, describen unas nanocápsulas de núcleo líquido y corteza sólida de naturaleza lipídica, que pueden ser obtenidas a partir de una microemulsión preparada mediante la técnica de inversión de fase por efecto térmico (emulsión PIT).

20 El documento US 2008/2536960 se refiere a plataformas lipoproteicas que comprenden un núcleo lipídico líquido y una corteza constituida de fosfolípidos, de colesterol no esterificados y de una proteína, en particular una apoproteína ApoB-100. La reacción de unión entre el ácido fólico y la ApoB-100 resulta de un acoplamiento peptídico.

25 Los documentos WO 2007/106683 y FR 2677272 describen unas partículas lipoproteicas que comprenden un núcleo no líquido y una corteza lipídica.

Estos sistemas de nanopartículas están, principalmente, dedicados a la encapsulación de un agente activo que, en función de su naturaleza, hidrófila, hidrófoba o hidrodispersable, estará presente en el núcleo y/o en la corteza.

30 En el sentido de la presente invención, se entiende por "encapsulación de un agente activo", su incorporación a nivel del núcleo o de la corteza de una nanocápsula, según su naturaleza, hidrófila, hidrófoba o hidrodispersable.

35 Sin embargo, estos sistemas vesiculares no se prestan simultáneamente al transporte de una gran variedad de agentes activos y/o a un control total de su capacidad de liberación y/o de orientación. En efecto, estos sistemas permiten la encapsulación sólo de agentes activos de peso molecular relativamente bajo, en particular de peso molecular inferior o igual a aproximadamente 5000 daltons. Por otra parte, sería ventajoso poder reforzar la estructura capsular de estas nanocápsulas para prevenir, por ejemplo, cualquier liberación intempestiva del agente activo que transportan o también incrementar la resistencia de su envoltura a los medios biológicos agresivos como, 40 por ejemplo, los jugos gástricos. Podría además, ser muy interesante poder funcionalizarlos fácilmente en la superficie, para, por ejemplo, asignarles un objetivo específico. Así, podrá ser particularmente interesante aprovechar unos ligandos de tipo galactosa para dirigir estas nanocápsulas hacia el receptor expresado por los hepatocitos o de tipo péptido arginina-glicina-aspartato RGD para orientar las integrinas $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ expresadas por algunos tumores fuertemente vascularizados.

45 La invención pretende precisamente proponer un modo de funcionalización de estos sistemas vesiculares que permiten conferirlos las ventajas antes citadas.

50 De manera inesperada, los inventores han constatado que la superficie externa de nanocápsulas puede prestarse a tal funcionalización, con la condición de que esta sea realizada en condiciones específicas.

Contra toda previsión, la funcionalización en la superficie de estas nanocápsulas no afecta a su estabilidad y no conlleva su disgregación, como se confirma en los ejemplos siguientes mediante las mediciones de difusión dinámica de la luz o por la obtención de imágenes por microscopía electrónica de transmisión.

55 Así, la presente invención pretende, según un primero de sus aspectos, una cápsula de tipo núcleo lipídico líquido/corteza lipídica sólida funcionalizada en la superficie con al menos un compuesto que contiene al menos una función amina, caracterizada por que la construcción núcleo/corteza lipídicos es de escala nanométrica y por que dicho compuesto está unido de manera covalente por medio de una reacción de transacilación a dicha corteza lipídica sólida.

60 Según otro de sus aspectos, la presente invención pretende un procedimiento útil para la funcionalización de nanopartículas de corteza lipídica sólida y núcleo lipídico líquido, comprendiendo dicho procedimiento al menos las etapas que consisten en:

65 i) disponer de nanocápsulas con corteza lipídica sólida y núcleo lipídico líquido,

ii) poner en contacto dichas nanocápsulas con una solución acuosa alcalina, a fin de activar su superficie para una reacción de transacilación,

5 iii) poner en contacto el medio ii) con al menos un compuesto que contiene al menos una función amina para formar, por transacilación, dichas cápsulas esperadas y, llegado el caso,

iv) neutralizar las cápsulas funcionalizadas así obtenidas, y

10 v) aislar dichas cápsulas funcionalizadas.

En efecto, el documento EP 0 693 963 describe la preparación de partículas cuya corteza es denominada "gelificada", a partir de polisacáridos esterificados, presentes en la corteza de la partícula considerada, y aptas para reaccionar con una poliamina por medio de una reacción de transacilación.

15 Sin embargo, además de su naturaleza muy diferente de las consideradas según la invención, las partículas de partida que sufren una reacción de transacilación poseen un tamaño que va desde algunos micrómetros hasta 10 milímetros.

20 Ahora bien, las partículas de tamaño más reducido, en particular de escala nanométrica, poseen ventajosamente una gran estabilidad coloidal. Las nanopartículas así funcionalizadas resisten a la floculación o a la agregación y tienen una vida útil más larga.

25 En el sentido de la presente invención, se entiende por "nanocápsulas funcionalizadas" unas nanocápsulas de corteza lipídica sólida, cuya superficie posee una estructura modificada con respecto a la superficie de las nanocápsulas en un estado no funcionalizado, siendo esta estructura en particular el resultado de un injerto en superficie de al menos uno o más compuestos que tienen al menos una función amina.

30 Con fines de simplificación, estos compuestos pueden también ser designados a continuación bajo la denominación de compuestos aminados. Tal compuesto puede ventajosamente poseer al menos dos, o al menos tres, incluso más funciones aminas.

35 Se comprende fácilmente que el anclaje de tales moléculas confiere a la nanocápsula así funcionalizada un tamaño superior a su tamaño inicial (es decir no funcionalizada). Así, si las nanocápsulas de origen poseen un tamaño medio inferior a 150 nm, preferentemente inferior a 100 nm, más preferentemente inferior a 50 nm, las cápsulas obtenidas tras su funcionalización pueden poseer, por su parte, un tamaño medio superior a 150 nm, incluso a 200 nm. El control del procedimiento, y en particular del tiempo de reacción, permite controlar el tamaño final de las nanocápsulas funcionalizadas, que ventajosamente puede seguir siendo inferior a 250 nm.

40 El compuesto aminado fijado a la superficie de las cápsulas según la invención puede además ser propicio para la fijación de una o más moléculas de interés.

45 Así, en el sentido de la invención, el término "compuesto aminado" cubre o bien un agente activo tal cual, denominado también molécula de interés, es decir una entidad dotada de una actividad biológica, farmacológica, cosmética, fitosanitaria, o bien una entidad química o biológica capaz de conferir una o más funcionalidades complementarias de las nanocápsulas, y en particular capaz de reforzar su estructura externa y/o permitir un reconocimiento específico del o de los agente(s) activo(s) asociado(s).

50 Ventajosamente, el compuesto aminado y/o la molécula de interés son de naturaleza proteica, peptídica, nucleica, polimérica o inorgánica, incluso organometálica.

En relación a las nanopartículas consideradas, un procedimiento según la invención es muy particularmente ventajoso para:

55 - reforzar su estructura nanocapsular,

- modificar su cinética de liberación de los principios activos encapsulados, llegado el caso

60 - incrementar su resistencia a los medios biológicos agresivos, tales como el tubo digestivo,

- proteger el núcleo oleoso que contiene uno o más agentes activos de cualquier agresión exterior (oxidación, luz),

65 - aprovechar estas nanopartículas para transportar unas moléculas de alto peso molecular o unos polímeros hidrófilos aptos para reaccionar después de la transacilación tales como unos ácidos nucleicos, los ARNs, las heparinas y derivados de heparinas, las proteínas y polipéptidos cargados negativamente o positivamente, los macro-poli-aniones, y/o

- permitir la presentación en la superficie de estas nanopartículas de moléculas que interactúan con el sistema inmunitario.

5 La presente invención pretende también, según otro de sus objetivos, la utilización de cápsulas según la invención para la preparación de composiciones.

Así, la invención se refiere a la utilización de al menos una cápsula según la invención para la preparación de una composición de interés terapéutico, cosmético o nutracéutico.

10 La presente invención pretende también por lo tanto unas composiciones, en particular unas composiciones farmacéuticas, que contienen al menos una cápsula según la invención en asociación con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable.

15 Cápsulas

A continuación, "LNC" significa "Lipidic Nanocapsules" o "nanocápsulas lipídicas".

20 Tal como se ha indicado anteriormente, las cápsulas según la invención corresponden en realidad a unas nanocápsulas de corteza lipídica sólida y núcleo lipídico líquido, funcionalizadas en la superficie por medio de un procedimiento de transacilación.

25 Las cápsulas así obtenidas poseen un tamaño medio comprendido entre 70 y 250 nm. Por supuesto, unas cápsulas de tamaño superior pueden ser obtenidas haciendo variar, de manera adecuada, los parámetros del procedimiento.

Tales variaciones son, por supuesto, de competencia del experto en la técnica.

30 Tales cápsulas pueden ser analizadas por difusión dinámica de la luz y difusión de los neutrones en los pequeños ángulos.

Como se ha indicado anteriormente, la corteza de las cápsulas comprende al menos un compuesto aminado injertado en su superficie de manera covalente por medio de una reacción de transacilación.

35 Según la presente invención, los términos "unido" e "injertado" se utilizan indiferentemente para designar el establecimiento de una unión covalente entre la corteza y el compuesto aminado, derivando esta unión de una reacción de transacilación establecida entre las dos entidades.

40 Según una primera variante, este compuesto aminado es, en sí mismo, una molécula de interés, tal como se ha descrito anteriormente, que es interesante transportar por medio de una cápsula conforme a la invención.

Como se ha precisado anteriormente, esta molécula de interés puede ser de naturaleza proteica, peptídica, nucleica o polimérica.

45 Puede tratarse en particular de una proteína, seleccionada preferentemente entre las proteínas hidrófilas o tratadas a fin de hacerlas hidrófilas, es decir solubles en agua o dispersables en agua, que contiene unos grupos aminados libres, unos polipéptidos o unos polímeros.

50 Unos ejemplos de proteínas que pueden ser utilizadas en la invención y que reúnen las condiciones que consisten en ser hidrófilas o bien que pueden ser tratadas para ser hidrófilas, son las albúminas como el suero de albúmina, en particular el suero de albúmina humana, la ovalbúmina, la alfa-lactalbúmina, unas globulinas, el fibrinógeno, la caseína, unas proteínas vegetales tales como las proteínas de soja o de trigo, unas gluteninas que habrán sido preferentemente degradadas, unas escleroproteínas solubilizadas, el colágeno, el atelocolágeno, la gelatina, los hidrolizados de gelatina, las peptonas, la hemoglobulina, unas enzimas tales como la catalasa, la fosfatasa alcalina, unas hormonas, unas inmunoglobulinas o unos anticuerpos tales como los anticuerpos monoclonales.

55 Ventajosamente, como ejemplos de polipéptido, se puede citar el poliácido aspártico, la poliarginina o también la polilisina.

60 A título de ejemplo de polímero, se pueden citar los polímeros sintéticos, y más particularmente el polietileno imina (PEI).

A título de ejemplo de ácido nucleico, se puede citar más particularmente el ARNsi.

65 Según una segunda variante que puede, llegado el caso, ser inherente a la primera variante, el compuesto aminado se utiliza para transportar un agente activo anexo más particularmente considerado en relación a su capacidad de orientación y/o de marcado. En el caso en el que el compuesto aminado es más particularmente considerado para

estos fines, es decir de agente que debe asegurar la unión de una molécula de interés a unas nanopartículas, se puede preferir más particularmente la selección de compuestos aminados seleccionados entre los anticuerpos monoclonales, los ligantes RGD, los azúcares aminados y la polilisina.

5 En lo referente a la molécula de interés representada por el agente activo, ésta puede ser conforme a la definición propuesta anteriormente para el compuesto aminado.

10 Puede tratarse también, por ejemplo, de una sustancia de interés para el diagnóstico que tiene por ejemplo unas entidades fluorescentes, luminescentes o fosforescentes, o también de una molécula dotada de una actividad biológica tal como una enzima, una hormona, un anticuerpo o la hemoglobina.

Según también otra variante, el compuesto aminado presenta un interés en relación a su capacidad para reforzar la resistencia de la superficie externa nanocapsular.

15 Puede tratarse así de cualquier molécula que comprende unas unidades polietilenglicol. Un recubrimiento de la superficie a base de tal compuesto es, en efecto, ventajoso para conferir una remanencia vascular incrementada debido a una reducción significativa de la captura de las nanocápsulas por los macrófagos hepáticos.

20 Según también otro modo de realización, las cápsulas según la invención son además ventajosas con relación al hecho de que pueden poseer, a nivel de su superficie externa, un cierto número de unidades anexas reactivas, tales como por ejemplo unas unidades aminas y ácidos propicios a acoplamiento con entidades anexas. Tales unidades están ventajosamente presentes en el compuesto aminado que sirvió para funcionalizar las nanocápsulas. Así, según también otra variante de realización, los compuestos aminados considerados según la invención pueden tener como interés significativo conferir a las nanocápsulas de origen una aptitud para asociarse, por medio de sus
25 unidades aminas fijadas por transacilación sobre la superficie de estas nanocápsulas, con otra(s) molécula(s) dotada(s) de interés en términos de efecto terapéutico, de marcado, de orientación y/o de protección de una eventual degradación generada por el medio ambiente circundante.

30 Las moléculas de interés, susceptibles de ser unidas de manera no covalente con un compuesto aminado, él mismo injertado en la superficie de la corteza lipídica de la cápsula, pueden ser o bien un agente activo, en particular un agente activo hidrófilo, más particularmente cargado negativamente, o bien una molécula dedicada a aportar una funcionalidad complementaria a la nanocápsula, en particular en términos de orientación/marcado o con fines de reforzar la resistencia y la estabilidad de la nanocápsula.

35 El activo puede ser un compuesto de interés terapéutico, en particular farmacéuticamente activo, cosméticamente activo o activo en un campo fitosanitario o alimenticio o nutracéutico.

40 Según un modo de realización preferido, este agente activo es un principio farmacéuticamente activo, tal como se ha definido anteriormente.

45 Las nanocápsulas de la invención son convenientes más particularmente para la administración de los principios activos siguientes: los anti-infecciosos incluyendo los antimicóticos; los antibióticos; los anticancerígenos; los inmunosupresores; los principios activos destinados al sistema nervioso central que deben pasar la barrera hematoencefálica, tales como los antiparkinsonianos, los analgésicos y más generalmente los principios activos para tratar las enfermedades neurodegenerativas.

50 Ventajosamente, tal agente activo puede ser de naturaleza proteica, polipeptídica, peptídica, pero puede también ser un ácido nucleico tal como un plásmido de ADN o un ARN de interferencia (o ARNsi), o un oligonucleótido antisentido o un aptámero. Llegado el caso, las cápsulas funcionalizadas por un agente activo, unido directamente o por medio de un compuesto aminado anexo a la corteza lipídica, pueden sufrir un tratamiento suplementario que pretende funcionalizar su superficie externa con un compuesto anexo, tal como por ejemplo una polilisina, a fin de reforzar la protección del agente activo fijado.

55 Las cápsulas así formadas pueden ser comparadas con un sistema multicapas.

Tal variante de realización se ilustra en el ejemplo 9.

Como se ha indicado anteriormente, las cápsulas según la invención comprenden una corteza lipídica sólida.

60 Corteza lipídica sólida

Esta corteza lipídica es sólida y comprende al menos un compuesto capaz de reaccionar con un compuesto aminado por medio de una reacción de transacilación. Se trata generalmente de un compuesto que comprende al menos una función éster.

65 Este compuesto portador de la función éster puede ser un compuesto que participa paralelamente en la formación y

en la constitución de la corteza lipídica sólida, tal cual, por ejemplo un tensioactivo lipófilo, incluso un compuesto anexo, introducido a nivel de la corteza lipídica únicamente con fines de establecer reacciones de transacilación.

Así, la corteza lipídica sólida comprende al menos un tensioactivo liposoluble o lipófilo.

Ventajosamente, el tensioactivo lipófilo es sólido a temperatura ambiente.

El tensioactivo lipófilo es más particularmente a base de fosfolípidos que son ventajosos en relación con su carácter biocompatible.

Entre los fosfolípidos, los fosfatidilcolinas (lecitinas) son muy particularmente interesantes.

Otros fosfolípidos pueden ser el fosfatidilglicerol, el fosfatidilinositol, la fosfatidilserina, el ácido fosfatídico, y la fosfatidiletanolamina.

Los derivados fosfolipídicos pueden ser aislados a partir de fuentes naturales o preparados por síntesis.

A título de productos comerciales que derivan de fosfolípidos, se puede citar más particularmente:

- EPICURON 120[®] (Lukas Meyer, Alemania) que es una mezcla de aproximadamente un 70% de fosfatidilcolina, un 12% de fosfatidiletanolamina, y aproximadamente un 15% de otros fosfolípidos;

- OVOTINE 160[®] (Lukas Meyer, Alemania) que es una mezcla que comprende aproximadamente un 60% de fosfatidilcolina, un 18% de fosfatidiletanolamina, y un 12% de otros fosfolípidos,

- una mezcla de fosfolípidos purificados tal como los productos Lipoïd E75[®] o Lipoïds E-80[®] (Lipoïd, Alemania) que es una mezcla de fosfolípidos que comprende aproximadamente un 80% en peso de fosfatidilcolina, un 8% en peso de fosfatidiletanolamina, un 3,6% en peso de lípidos no polares y un 2% de esfingomielina.

Según un modo de realización preferido, el tensioactivo lipófilo es una lecitina cuya proporción en fosfatidilcolina varía del 40 al 80% en peso.

Conviene muy particularmente como fuente de fosfatidilcolina, el Lipoïd S75-3[®] (Lipoïd GmbH, Alemania). Se trata de lecitina de soja. Esta última contiene aproximadamente un 69% de fosfatidilcolina y un 9% de fosfatidiletanolamina. Este constituyente es el único que constituye un sólido a 37°C y a temperatura ambiente en la formulación. Se puede utilizar el poligliceril-6-dioleato (Plurol[®]).

Ventajosamente, el o los tensioactivos antes citados pueden ser asociados a unos co-tensioactivos como, por ejemplo, otros fosfolípidos. Para ello, las fosfatidilcolinas (lecitina) son particularmente interesantes.

Otros fosfolípidos que son convenientes para la invención pueden ser el fosfatidilglicerol, el fosfatidilinositol, la fosfatidilserina, el ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina.

Ventajosamente, según una variante de realización, la corteza lipídica sólida está formada de al menos un sistema tensioactivo que comprende un tensioactivo liposoluble tal como se ha definido anteriormente y un tensioactivo termosensible, hidrófilo y no iónico.

Ventajosamente, un tensioactivo termosensible, hidrófilo y no iónico es hidrófilo anfífilo.

Los tensioactivos emulsionantes habitualmente utilizados tienen un HLB (HLB = Hydrophilic Lipophilic Balance (balance hidrófilo-lipófilo en español)) que va de 8 a 18.

Estos tensioactivos se pueden seleccionar entre los alcoholes grasos etoxilados, los ácidos grasos etoxilados, los glicéridos parciales de ácidos grasos etoxilados, los triglicéridos de ácidos grasos polietoxilados, y sus mezclas.

Como alcoholes grasos etoxilados, se pueden citar por ejemplo los productos de adición de óxido de etileno con el alcohol laurílico, en particular los que comprenden de 9 a 50 grupos oxietilenados (Laureth-9 a Leureth-50 en nombres CTFA); los productos de adición de óxido de etileno con el alcohol behenílico, en particular los que comprenden de 9 a 50 grupos oxietilenados (Beheneth-9 a Beheneth-50 en nombre CTFA); los productos de adición de óxido de etileno con el alcohol cetostearílico (mezcla de alcohol cetílico y de alcohol estearílico), en particular los que comprenden de 9 a 30 grupos oxietilenados (Ceteareth-9 a Ceteareth-30 en nombres CTFA); los productos de adición de óxido de etileno con el alcohol cetílico, en particular los que comprenden de 9 a 30 grupos oxietilenados (Ceteth-9 a Ceteth-30 en nombres CTFA); los productos de adición de óxido de etileno con el alcohol estearílico, en particular los que comprenden de 9 a 30 grupos oxietilenados (Steareth-9 a Steareth-30 en nombres CTFA); los productos de adición de óxido de etileno con el alcohol isoestearílico, en particular los que comprenden de 9 a 50 grupos oxietilenados (Isosteareth-9 a Isosteareth-50 en nombres CTFA); y sus mezclas.

Como ácidos grasos etoxilados, se pueden citar por ejemplo los productos de adición de óxido de etileno con los ácidos láurico, palmítico, esteárico o behénico, y sus mezclas, en particular los que comprenden de 9 a 50 grupos oxietilenados tales como los lauratos de PEG-9 a PEG-50 (en nombres CTFA: PEG-9 laurate a PEG-50 laurate); los palmitatos de PEG-9 a PEG-50 (en nombres CTFA: PEG-9 palmitate a PEG-50 palmitate); los estearatos de PEG-9 a PEG-50 (en nombres CTFA: PEG-9 stearate a PEG-50 stearate); los palmito-estearatos de PEG-9 a PEG-50; los behenatos de PEG-9 a PEG-50 (en nombres CTFA: PEG-9 behenate a PEG-50 behenate); y sus mezclas.

Se pueden utilizar también unas mezclas de estos derivados oxietilenados de alcoholes grasos y de ácidos grasos.

Estos tensioactivos pueden también ser unos compuestos naturales, tal como unos fosfolípidos o unos compuestos sintéticos tales como los polisorbatos, que son unos ésteres de ácido graso de sorbitol polietoxilado (Tween[®]), los ésteres de polietilenglicol de ácido graso que provienen por ejemplo del aceite de ricino (Crémophor[®]), unos ácidos grasos polietoxilados, por ejemplo ácido esteárico (Simulsol M-53[®]), unos éteres de alcohol grasos polioxietilenados (Brij[®]), unos éteres no fenilo polioxietilenados (Triton N[®]), unos éteres hidroxifenilo polioxietilenados (Triton X[®]).

Puede tratarse más particularmente de un 2-hidroxiestearato de polietilenglicol y en particular el comercializado bajo el nombre de Solutol[®] HS15 por la compañía BASF (Alemania).

Según un modo de realización preferido, la corteza contiene al menos un sistema tensioactivo formado de una lecitina y de un 2-hidroxiestearato de polietilenglicol y en particular el comercializado bajo la denominación de Solutil[®] HS 15.

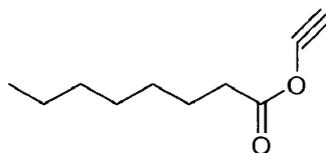
Según una primera variante de realización, al menos un tensioactivo antes citado está, con la condición de que posea una función éster, implicado por otro lado en al menos una reacción de transacilación considerada según la invención.

Según una segunda variante de realización, la corteza lipídica comprende, además de al menos uno de los tensioactivos antes citados, al menos un éster de alcohol distinto de dichos tensioactivos, presente para asegurar al menos una reacción de transacilación requerida según la invención.

Ventajosamente, el número de carbono de dicho éster de alcohol es un número entero inferior o igual a 12, más particularmente inferior o igual a 10, aún más particularmente inferior o igual a 8.

Tales ésteres son ilustrados en el ejemplo 6.

Entre los ésteres de alcohol que son convenientes para la presente invención, el éster que responde a la fórmula siguiente es particularmente interesante:



La incorporación de estos ésteres en una formulación de nanocápsulas lipídicas según la invención puede realizarse en una proporción ponderal del orden del 1 al 25% en peso y más particularmente del 5 al 20% en peso con respecto al peso total de la mezcla de los tensioactivo(s) y de los ésteres considerados para la formación de la corteza lipídica.

De manera general, unas cápsulas conformes a la invención pueden contener del orden del 1 al 10% en peso de ésteres de alcohol distintos de los tensioactivos que contienen por otra parte, con respecto a su peso total, teniendo en cuenta sólo las sustancias inorgánicas de la formulación.

El uso de éster de alcohol según la presente invención permite reforzar significativamente la estabilidad de las propiedades iniciales de LNC, en particular a nivel de su estabilidad coloidal y de su sigilo. Otra ventaja, conferida por la utilización de tales ésteres de alcohol a título de sitios para la reacción de transacilación a nivel de la corteza lipídica de las cápsulas según la presente invención, se basa en su gran accesibilidad a los reactivos potencialmente utilizables durante esta etapa de transacilación con, como resultado, una mejora del rendimiento de fijación, como se puede ver en los ejemplos.

Por supuesto, las dos variantes de realización de reacción de transacilación antes citadas pueden coexistir en una cápsula según la invención, con la condición por supuesto que la corteza de esta contenga, además de los tensioactivos en particular lipófilos, al menos un éster de alcohol tal como se ha definido anteriormente.

La envoltura puede, llegado el caso, encapsular además al menos un agente activo. En este caso, se tratará más bien de un agente activo de naturaleza liposoluble o lipodispersable.

5 Ventajosamente, tales agentes activos liposolubles o lipodispersables están ya presentes en las nanocápsulas de partida, realizadas en la etapa i) del procedimiento de preparación según la invención.

Según un modo de realización, la corteza lipídica sólida no contiene proteínas.

10 Las cápsulas según la presente invención comprenden por otro lado un núcleo lipídico líquido.

Núcleo lipídico líquido

15 El núcleo lipídico líquido comprende al menos una fase grasa oleosa formada de al menos un cuerpo graso líquido o semi-líquido, y en particular de al menos un triglicérido, de un éster de ácido graso, o de una de sus mezclas.

El éster de ácido graso se puede seleccionar más particularmente de entre los ésteres de ácidos grasos de C₈ a C₁₈, en particular de C₈ a C₁₂, y particularmente el palmitato de etilo, el oleato de etilo, el miristato de etilo, el miristato de isopropilo, el miristato de octidodecilo, y sus mezclas.

20 Los triglicéridos utilizados pueden ser unos triglicéridos de síntesis o unos triglicéridos de origen natural. Las fuentes naturales pueden incluir las grasas animales o los aceites vegetales, por ejemplo los aceites de soja o las fuentes en triglicéridos de cadena larga (LCT).

25 Otros triglicéridos de interés están compuestos principalmente de ácidos grasos de longitudes medias también denominados triglicéridos de cadena media (MCT). Un aceite de triglicéridos de cadena media (MCT) es un triglicérido en el que la cadena carbohidrato tiene de 8 a 12 átomos de carbono.

Tales aceites MCT están disponibles comercialmente.

30 A título de ejemplo de estos aceites MCT, se pueden citar los TCR (nombre comercial de la compañía industrial de los oleaginosos, Francia, para una mezcla de triglicéridos en la que aproximadamente el 95% de las cadenas de ácidos grasos poseen 8 o 10 átomos de carbono) y el Miglyol[®] 812 (triglicérido comercializado por la compañía Dynamit Nobel Suède, para una mezcla de triésteres de glicéridos de ácidos caprílico y cáprico).

35 Las unidades de ácidos grasos de estos triglicéridos pueden ser insaturadas, monoinsaturadas o poliinsaturadas. Las mezclas de triglicéridos que tienen unas unidades de ácidos grasos variables son también aceptables.

40 El índice HLB o equilibrio hidrófilo-lipófilo es tal como se define por C-Larpen en el tratado K.342 de las Editions Techniques de l'Ingenieur.

Es muy particularmente conveniente para la invención el triglicérido comercializado bajo el nombre de Labrafac WL 1349[®].

45 En un modo de realización preferido, la fase grasa es un triglicérido de ácido graso.

Como se ha indicado anteriormente, el núcleo lipídico líquido puede, llegado el caso, encapsular en su seno un agente activo. Este agente activo es preferentemente liposoluble. Sin embargo, unos agentes activos de naturaleza hidrosoluble o hidrodispersable pueden también ser encapsulados en el núcleo lipídico. En este caso, deberá sufrir una formulación previa a su encapsulación.

50 Por ejemplo, el agente activo podrá presentarse en forma de micelas inversas o de microemulsiones, como se describe por ejemplo en los documentos WO 09/001019 y FR 2 916 974, respectivamente.

55 A título ilustrativo y no limitativo de agentes activos que pueden ser encapsulados según la invención, se puede citar la doxorrubicina y sus sales de adición a un ácido farmacéuticamente aceptable y más particularmente el clorhidrato, y unas heparinas de bajo peso molecular.

Procedimiento de preparación de capsulas según la invención

60 Como se ha indicado anteriormente, unas cápsulas en estado nanoparticulada sufren una reacción de transacilación, entre al menos un constituyente de su corteza lipídica sólida y al menos un compuesto aminado.

65 Esta reacción de transacilación corresponde a una reacción de intercambios de grupo(s) acilo(s) entre un compuesto de la envoltura lipídica, preferentemente un tensioactivo, en particular un tensioactivo liposoluble, o un éster de alcohol, si está presente, tales como se han descrito anteriormente, y el compuesto aminado considerado.

Según una variante de realización preferida, dicho tensioactivo liposoluble es una lecitina.

Ventajosamente, tal reacción es simple de realizar y no requiere manipulación delicada.

5 La primera etapa de esta reacción consiste en una alcalinización de la superficie de las nanocápsulas para activarlas, frente a una reacción de transacilación, por ejemplo, por contacto de estas nanocápsulas con al menos una solución acuosa alcalina.

10 Ventajosamente, la cantidad de agente alcalino a añadir a la fase acuosa en la que se dispersan directamente las nanocápsulas, para provocar la reacción de transacilación, es tal que el pH de la suspensión acuosa de nanocápsulas está comprendido entre 8 y 14, y aún más preferentemente entre 8 y 10.

15 El agente alcalino a añadir para provocar la reacción de transacilación se puede seleccionar entre la sosa, la potasa o un compuesto aminado tal como, por ejemplo, la trietilamina.

La segunda etapa de esta reacción consiste en la puesta en contacto de estas nanocápsulas alcalinizadas con al menos un compuesto aminado en condiciones propicias para la transacilación. La reacción se deja preferentemente bajo agitación el tiempo necesario para el desarrollo de la reacción, es decir entre 5 y 30 minutos.

20 Por ejemplo, el tiempo durante el cual las partículas son mantenidas dentro de la solución alcalina para que se desarrolle la reacción de transacilación puede estar comprendido entre 5 minutos y 1 hora, preferentemente entre 5 minutos y 30 minutos, más preferentemente, es de 15 minutos.

25 Dicho compuesto aminado empleado en la reacción de transacilación que funcionaliza las nanocápsulas según la presente invención es ventajosamente tal como se ha definido anteriormente.

30 El rendimiento de la reacción de transacilación puede ser incrementado por aumento de la duración de dicha reacción de transacilación y/o por variaciones de la composición de la solución alcalina que provoca dicha reacción de transacilación, y en particular, por aumento de la cantidad de agente alcalino utilizado para preparar dicha solución alcalina.

35 Ventajosamente, se realiza, al final de la transacilación, una última etapa de neutralización del medio de reacción por adición de una solución de ácido clorhídrico de concentración adecuada, generalmente comprendido entre 0,1 mol/litro y 6 mol/litro, debiendo ser el pH vuelto a llevar a un valor comprendido entre 7 y 7,4.

40 El agente ácido utilizado para neutralizar la suspensión acuosa de partículas después de la reacción de transacilación se puede seleccionar entre los ácidos orgánicos monocarboxílicos o policarboxílicos, portadores o no de funciones alcohol, como el ácido acético, el ácido cítrico, el ácido tártrico, el ácido succínico, el ácido málico, el ácido láctico o un ácido mineral como el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico.

Este tiempo de neutralización de las partículas, es decir el tiempo de agitación necesario después de la adición del ácido al medio de reacción, puede estar comprendido entre 5 minutos y 1 hora, preferentemente entre 5 minutos y 30 minutos, más preferentemente es de 15 minutos.

45 Las nanocápsulas modificadas pueden ser después purificadas según los métodos de purificación bien conocidos por el experto en la materia, tal como la técnica de diálisis, filtración o las técnicas cromatográficas (HPLC por ejemplo, columna intercambiadora de iones, separación por exclusión estérica).

50 Procedimiento de preparación de las nanocápsulas de partida

En el sentido de la invención, el término nanocápsulas se distingue de nanoesferas. Se entiende por nanocápsulas unas partículas constituidas de un núcleo líquido o semilíquido a temperatura ambiente, recubierto de una película o corteza sólida a temperatura ambiente, por oposición a unas nanoesferas, que son unas partículas matriciales, es decir cuya totalidad de la masa es sólida. Así, cuando las nanoesferas contienen un principio farmacéuticamente activo, éste está finamente disperso en la matriz sólida.

60 Ventajosamente, las nanocápsulas de la etapa i) del procedimiento según la invención, es decir las nanocápsulas en un estado no funcionalizado, es decir que no han sufrido transacilación, poseen un tamaño medio inferior a 150 nm, preferentemente inferior a 100 nm, más preferentemente inferior a 50 nm. Estos tamaños pueden ser determinados por espectroscopía de correlación de fotones, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión en modo crioscópico.

65 El grosor de la película o corteza sólida está ventajosamente comprendido entre 2 y 10 nm. Es igual a aproximadamente la décima parte del diámetro de las partículas. Este grosor se puede calcular por balance de masas, o visualizado por microscopía electrónica de transmisión por sombreado negativo, o bien por microscopía electrónica de transmisión en modo crioscópico o por difusión de los neutrones a los pequeños ángulos.

Debido a su tamaño, las nanocápsulas de partida son unas partículas lipídicas coloidales.

5 El índice de polidispersidad de las nanocápsulas de la invención está ventajosamente comprendido entre el 5 y el 15%. Este índice se determina en el histograma de tamaño obtenido por el método de espectroscopía de correlación de fotones.

10 Las nanopartículas están cada una constituidas de un núcleo esencialmente lipídico líquido o semilíquido a temperatura ambiente, recubierto de una corteza esencialmente lipídica sólida a temperatura ambiente.

15 En el sentido de la invención, la expresión "esencialmente lipídica" significa que el núcleo y la corteza que forman las nanocápsulas según la invención están constituidos de más del 50% en peso, en particular de más del 75% en peso, en particular de más del 80% en peso, incluso de más del 90%, más particularmente de más del 95% de su peso respectivo, incluso en su totalidad de uno o más compuestos lipídicos (hidrófobos). Estos porcentajes se aprecian considerando que forman parte de la fase líquida los tensioactivos que están presentes.

En el sentido de la invención, la expresión temperatura ambiente designa una temperatura que varía de 18 a 25°C.

20 Las nanocápsulas de partida pueden ser obtenidas ventajosamente según un procedimiento que comprende al menos las etapas que consisten en:

- a) disponer de una microemulsión formulada por inversión de fase de una emulsión y estabilizada por al menos un sistema tensioactivo que contiene al menos un tensioactivo liposoluble, tal como se ha definido anteriormente,
- 25 b) efectuar el temple de dicha microemulsión a fin de obtener unas nanocápsulas formadas de un núcleo lipídico, líquido a temperatura ambiente y recubierto de una película lipídica sólida a temperatura ambiente.

30 Una microemulsión muy particularmente conveniente para la formación de nanocápsula de partida comprende al menos una fase grasa oleosa, una fase acuosa y un sistema tensioactivo que comprende al menos un tensioactivo lipófilo tales como se han definido anteriormente, y preferentemente, además, un tensioactivo termosensible, hidrófilo y no iónico y, llegado el caso, al menos un éster de alcohol, cuyo número de carbono es preferiblemente un número entero inferior o igual a 12, más particularmente inferior o igual a 10, aún más preferiblemente inferior o igual a 8.

35 Tal microemulsión se puede preparar de la siguiente manera.

40 El conjunto de los constituyentes destinados a formar la microemulsión se pesa en un recipiente. La mezcla se homogeneiza, por ejemplo mediante un Rayneri 350 rpm, y se calienta aumentando progresivamente la temperatura mediante un baño maría hasta una temperatura superior o igual a la temperatura de inversión de fase T_2 , es decir hasta la obtención de una fase blanca más viscosa que indica la obtención de la emulsión inversa. El calentamiento se detiene entonces y la agitación se mantiene hasta el retorno a la temperatura ambiente, pasando por la temperatura de inversión de fase T_1 , es decir la temperatura a la que se forma la microemulsión esperada, en forma de una fase transparente o translúcida. Se señala que cuando la temperatura ha bajado por debajo de la zona de inversión de fase en temperatura (T_1), se obtiene de nuevo la emulsión de partida. Esta sucesión de operación es ventajosamente repetida y cuando se encuentra de nuevo a temperatura T_1 de inversión de fase, se enfría para formar las nanocápsulas esperadas.

Tal técnica está más particularmente descrita en los documentos FR 2 916 974 y EP 1 265 698 antes citados.

50 En el caso en el que se desee encapsular un agente activo, en particular de naturaleza lipófila dentro del núcleo lipídico, tales nanocápsulas de partida se pueden obtener según un procedimiento de preparación similar, que comprende dos etapas suplementarias entre las etapas a) y b) antes citadas, que consisten en:

- 55 - disponer de una segunda composición, distinta de dicha microemulsión y formada en todo o parte de al menos un agente activo,
- poner en contacto dicha microemulsión con dicha segunda composición en condiciones propicias para la interacción de dicho agente activo con dicha microemulsión.

60 Tal procedimiento está más particularmente detallado en el documento FR 2 916 974.

Alternativamente, tales nanocápsulas de partida que encapsulan un agente activo se pueden preparar según un procedimiento de preparación que comprende al menos las etapas que consisten en:

- 65 - disponer de por lo menos una primera microemulsión de carácter agua-en-aceite, estabilizada por al menos un tensioactivo lipófilo tal como se ha definido anteriormente y que contiene a nivel de su fase hidrófila al menos un

agente activo, en particular a carácter hidrófilo o hidrodispersable, tal como se ha definido anteriormente,

- disponer de al menos una segunda microemulsión, distinta de la primera microemulsión, formulada por inversión de fase de una emulsión y estabilizada por al menos un tensioactivo termosensible, no iónico e hidrófilo, tal como se ha definido anteriormente

- añadir dicha primera microemulsión en dicha segunda microemulsión, en condiciones propicias para la formación de una nueva microemulsión que internaliza dicho agente activo a nivel de su fase hidrófila, y

- efectuar el temple de dicha microemulsión obtenida en la etapa anterior, a fin de obtener las nanocápsulas esperadas.

Según una variante de realización, al menos una de las microemulsiones, y preferentemente la primera, contiene además al menos un éster de alcohol distinto de los tensioactivos.

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos y las figuras siguientes, que se presentan a título ilustrativo y no limitativo del campo de la invención.

Figuras:

- figura 1: Evolución del tamaño (en nm) de las nanocápsulas obtenidas según el procedimiento de preparación de la invención, en función del volumen de NaOH (1N) añadido (en μl), en presencia de una cantidad constante de seroalbúmina humana.

- figura 2: Evolución del tamaño (en nm) de las nanocápsulas según el procedimiento de preparación de la invención en función del volumen de NaOH (10 N) añadido (en μl), en presencia de una cantidad constante de seroalbúmina humana.

- figura 3: Evolución del tamaño (en nm) de las nanocápsulas obtenidas según el procedimiento de preparación de la invención, en función del tiempo de reacción y para un volumen de NaOH (10N) fijo, de 500 μl , en presencia de una cantidad constante de seroalbúmina humana.

- figura 4: Evolución del potencial zeta (en mV) de las nanocápsulas obtenidas según el procedimiento de preparación de la invención, en función del volumen de polilisina añadido (en μl).

- figura 5: Evolución de la viabilidad celular relativa (en %) sobre una línea de células U87MG en función de la concentración en nanocápsulas, modificadas o no, obtenidas según el procedimiento de preparación de la invención.

- figura 6: Evolución de la relación I/I_0 en función de la concentración en LNC modificadas por transacilación, representando I la intensidad de fluorescencia de complejos fluorescentes BSA-GITC absorbidas en estas LNC, mientras que I_0 representa la intensidad de fluorescencia de la BSA-FITC libre en solución.

- figura 7: Evolución de la relación I/I_0 en función de la concentración en LNC modificadas por transacilación, representando I la intensidad de fluorescencia de complejos fluorescentes ARNsi-FITC absorbidas en estas LNC, mientras que I_0 representa la intensidad de fluorescencia de la ARNsi-FITC libre en solución.

Ejemplo 1: Preparación de nanocápsulas funcionalizadas por la albúmina sérica humana

1. Preparación de una microemulsión no cargada de agente activo

Se realizan 5 g de una emulsión que contiene 750 mg de Lipoïd S75-3[®], 504 mg de Labrafac WL 1349[®] lipófilo, 504 mg de Solutol HS[®], 15,383 g de agua y 88 mg de cloruro de sodio.

El conjunto se reúne en un mismo vaso de precipitados y se coloca bajo agitación magnética. Se calienta hasta alcanzar una temperatura de 85°C. Todavía bajo agitación magnética, se deja enfriar el sistema hasta una temperatura de 60°C. Estos ciclos térmicos (entre 85°C y 60°C) son realizados tres veces a fin de obtener unas microemulsiones cada vez mejor estructuradas. El sistema se mantiene entonces en forma de microemulsión estabilizándolo a una temperatura comprendida en (o próxima a) la Zona de Inversión de Fase, en este caso 65°C.

2. Obtención de LNC

La microemulsión estabilizada a temperatura de inversión de fase se enfría o bien bruscamente, o bien diluida con agua fría a fin de formar una suspensión de LNC.

3. Fijación de la albúmina sérica humana

Se incuban 10 ml de nanocápsulas denominadas LNC durante 10 minutos, bajo agitación, en presencia de NaOH (1N) (volumen variable de 0 a 2000 μ l). Después, se añaden 500 μ l de solución de seroalbúmina humana con el 5% de masa. Se deja reaccionar durante 15 minutos, después se neutraliza la solución con una solución de ácido clorhídrico de concentración igual a 1 M, dependiendo el volumen del volumen de sosa utilizado al principio. Los resultados obtenidos son indicados en la figura 1.

Ejemplo 2: Preparación de nanocápsulas funcionalizadas por albúmina sérica humana

Las LNC funcionalizadas se preparan por analogía con el procedimiento descrito en el ejemplo 1, utilizando esa vez una solución de NaOH (10N).

Los resultados obtenidos son indicados en la figura 2.

Ejemplo 3 Preparación de nanocápsulas funcionalizadas por albúmina sérica humana

Las LNC funcionalizadas se preparan por analogía con el procedimiento descrito en el ejemplo 2, haciendo variar esta vez el tiempo de reacción de 0 a 30 minutos.

Los resultados obtenidos son indicados en la figura 3.

Ejemplo 4: Preparación de nanocápsulas funcionalizadas por polilisina FITC

Se procede por analogía con el modo de preparación del ejemplo 1, haciendo variar esta vez el volumen de polilisina añadido de 0 a 200 μ l. Se mide el potencial zeta en función del volumen de polilisina añadido.

Los resultados obtenidos son indicados en la figura 4.

Aparece muy claramente una dependencia entre el potencial zeta de las nanocápsulas lipídicas modificadas y la cantidad de polilisina introducida en la mezcla de reacción, es decir una relación entre la cantidad de polilisina fijada sobre las nanocápsulas lipídicas y el potencial zeta de estas últimas, lo que condiciona su aptitud para fijar unas moléculas hidrófilas cargadas negativamente.

Además, es posible seguir, en el transcurso de las etapas de producción, la cantidad de proteínas fijada sobre las nanocápsulas lipídicas.

La tabla I siguiente presenta los resultados de ensayo de las proteínas antes y después de la etapa de diálisis. El ensayo se basa en el método μ BCA.

El μ BCA es un método de determinación espectrofotométrico, basado en la absorción de la luz por un complejo formado por las proteínas a ensayar y el reactivo μ BCA. Este método requiere la utilización de un rango de referencia realizada a partir de una solución de proteínas de concentración conocida (μ BCA de PIERCE).

Tabla I

Muestras n°	Concentración de proteínas antes de la diálisis en μ g por ml	Muestras n°	Concentración de proteínas antes de la diálisis en μ g por ml
1	184,28	1	310
2	371,42	2	281,42
3	601,42	3	448,57
4	642,85	4	622,85
5	1228,57	5	530
6	1002,85	6	504,28
7	1274,28	7	982,85

Ejemplo 5: Utilización de nanocápsulas funcionalizadas por polilisina FITC para la complejación de ARNs

Las nanocápsulas funcionalizadas por polilisina FITC se preparan por analogía con el modo de preparación del ejemplo 1, en presencia de 0,5 μ l de LNC de 50 nm y 400 μ l de PLL-FITC. El conjunto se dializa, se filtra y se ajusta el pH a 7,4.

Estas partículas funcionalizadas por la polilisina FITC se ponen después en contacto con diferentes volúmenes (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 y 20 μ l) de ARNs (20 pb es decir 16 000 Daltons) de concentración 0,001 μ mol/ml.

El conjunto de las mezclas así preparadas se caracteriza sobre gel electroforético.

Con fines comparativos, se realiza también el gel electroforético del ARNs solo, y el de un estándar de PCR 20 pb

representativo de bajo peso molecular.

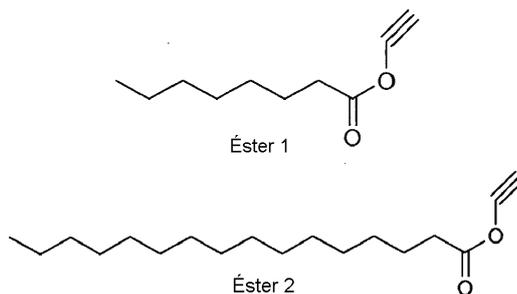
Cabe señalar que, para todas las mezclas formadas a partir de, respectivamente, 2 μl a 15 μl de la solución de ARNsi, un único punto aparece en el gel electroforético, que corresponde al ARNsi complejado.

Sin embargo, más allá de 15 μl , se constata sólo una complejación parcial del ARNsi. Parece por lo tanto que más allá de 15 μl de ARNsi (0,001 $\mu\text{mol/ml}$) se supera la capacidad de fijación de LNC.

Ejemplo 6: Preparación de nanocápsulas funcionalizadas por ésteres de alcoholes

1) Síntesis de los ésteres

Se han sintetizado dos ésteres de alcohol, éster 1 y éster 2, y presentan las estructuras químicas siguientes:



Estos dos ésteres son sintetizados según el protocolo siguiente.

En un matraz de tres bocas de 250 ml, se introduce en primer lugar 0,1 mol, respectivamente, de cloruro de octanoilo (Ref. O4733, Sigma-Aldrich) o de cloruro de palmitoilo (Ref. P78, Sigma-Aldrich), después 150 ml de éter dietílico (Ref. 346136, Sigma-Aldrich). Después de la agitación magnética, la mezcla se enfría con la ayuda de un baño de agua helada antes de la introducción sucesiva de 0,15 mol de alcohol y después de 0,15 mol de trietilamina (Ref. T0886, Sigma-Aldrich).

Después de la retirada del baño de agua helada, la mezcla se lleva a reflujo durante 2 horas.

Después de detener el calentamiento y el enfriamiento, la mezcla de reacción se filtra sobre papel fieltro antes de proceder a una extracción líquido-líquido con la ayuda del diclorometano (Ref. 443484, Sigma-Aldrich).

La fase orgánica se lava sucesivamente con agua (dos veces 500 ml) y después una solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se seca después con la ayuda de sulfato de sodio anhidro, después se pone bajo presión reducida para la evaporación de los disolventes.

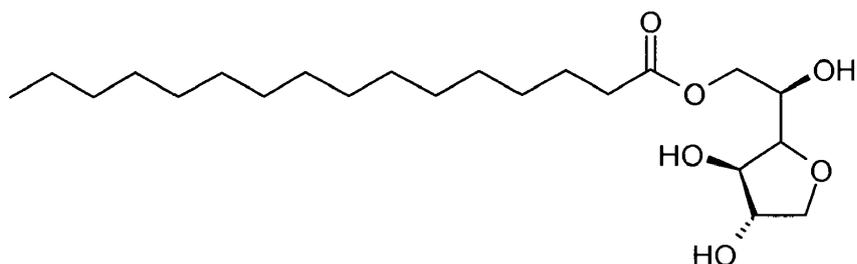
El producto deseado se obtiene en forma de un líquido incoloro (éster 1) o de un sólido cristalino blanco (éster 2). Después del secado del producto bajo presión reducida, éste se pesa y se calcula el rendimiento de la reacción.

Este último está comprendido entre el 90 y el 95%.

2) Obtención de LNC cargadas de ésteres

Se han obtenido unas nanocápsulas no cargadas de agentes activos mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1, comprendiendo la emulsión también esa vez una cantidad de éster 1, de éster 2 o de Span 40[®], en una cantidad del 10 o del 20% en masa de la cantidad de tensioactivos presentes en la emulsión (Solutol HS-15 y Lipoïd S75-3).

El Span 40[®] (Ref 85545, Fluka) es un éster de fórmula siguiente:



3) Fijación de la seroalbúmina humana

5 Las LNC se funcionalizan según el protocolo descrito en el ejemplo 1.

4) Resultados

Las características fisicoquímicas de las nanocápsulas lipídicas así producidas se detallan en la Tabla II siguiente:

10

Tabla II

Nombre de la muestra	Diámetro hidrodinámico en nm (*)	Potencial zeta en mV (**)
LNCs 50nm + 10% éster 2	30,1	-15
LNCs 50nm + 20% éster 2	32	-12
LNCs 50nm + 10% éster 2 transacilación PEI	40,1	25,5
LNCs 50nm + 20% éster 2 transacilación PEI	44,1	37,3
LNCs 50nm + 10% éster 1	31,3	-23,9
LNCs 50nm + 20% éster 1	35,2	-29,3
LNCs 50nm + 10% éster 1 transacilación PEI	52	34,3
LNCs 50nm + 20% éster 1 transacilación PEI	54,5	38,7
LNCs 50nm + 10% Span 40	52	-7
LNCs 50nm + 20% Span 40	85	42
LNCs 50nm + 10% Span 40 transacilación PEI	48	-4
LNCs 50nm + 20% Span 40 transacilación PEI	90,2	24,8

(*) y (**): estos valores se han medido con la ayuda de un NanoZS (Malvern Instruments).

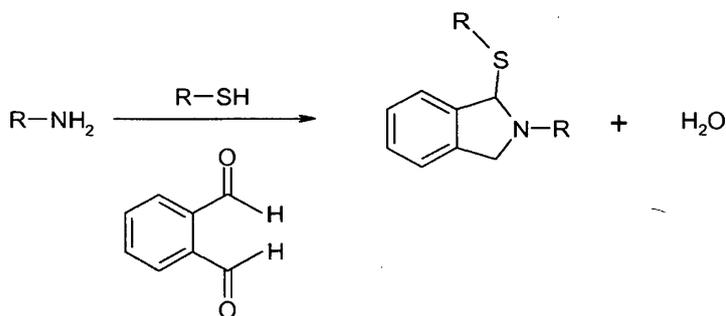
Ejemplo 7: Medición del rendimiento de transacilación en presencia de ésteres

15

Después de la purificación, se realizó un ensayo de los reactivos de transacilación a fin de visualizar el aumento del rendimiento de transacilación relacionado al uso de ésteres anteriormente citados.

20

El método de determinación se basa en el uso de o-ftaldialdehído (OPA) como reactivo, y se desarrolla según la ecuación de balance siguiente:



25

Los derivados indoles producidos son fluorescentes y permiten cuantificar la totalidad de los grupos aminos primarias presentes en la muestra de nanocápsulas.

30

En primer lugar, se realiza un rango de referencia de la sustancia a ensayar. Para esto, la sustancia se disuelve a diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 200 µg/ml) en agua a pH 7,4. La fluorescencia de estas soluciones se evalúa a 460 nm, para una longitud de onda de excitación de 355 nm.

La sustancia de interés se determina después en las muestras de nanocápsulas lipídicas añadiendo 300 µl de OPA a 30 µl de solución de LNC.

La fluorescencia de esta solución se mide a 460 nm y la concentración en sustancia se calcula con la ayuda del rango de referencia.

5 Este método de ensayo se utilizó con éxito para ensayar el reactivo injertado sobre las nanopartículas lipídicas durante la etapa de transacilación. Para cada reactivo (poli-L-lisina (PLL) y polietileno imina (PEI)), se ha utilizado una rango de referencia específico.

Los resultados del ensayo, realizado después de la purificación de la muestra, se detallan en la Tabla II siguiente:

10

Tabla III

Nombre de la muestra	Concentración en polímero µg/ml	Rendimiento de fijación en %
LNCs 50nm transacilación Poly-L-lisina	0,98	0,98
LNCs 50nm + 10% éster 1 transacilación PEI	15	15
LNCs 50nm + 20% éster 1 transacilación PEI	23	23
LNCs 50nm + 10% éster 2 transacilación PEI	ND	ND
LNCs 50nm + 20% éster 2 transacilación PEI	1,6	1,6
LNCs 50nm + 10% Span 40 transacilación PEI	1,06	1,06
LNCs 50nm + 20% Span 40 transacilación PEI	2,53	2,53

El rendimiento de fijación corresponde a la relación entre la cantidad de sustancia injertada en las LNC (CR) sobre la cantidad teórica máxima de esta sustancia (CT).

15 La sustancia injertada se ensaya mediante el método OPA a fin de obtener el CR. El rendimiento de fijación R puede entonces escribirse:

$$R = (CR/CT)*100$$

20 Como se puede observar en esta tabla, cuando la reacción de transacilación se produce sobre unas nanocápsulas clásicas (LNC 50 nm transacilación poli-L-lisina), el rendimiento de fijación es próximo del 1%.

La introducción del 10 o del 20% del éster 2 o de Span 40 en la formulación permite multiplicar este rendimiento por un factor comprendido entre 2 y 3.

25

La introducción del 10 o del 20% del éster 1 en la formulación provoca, por su parte, un aumento del rendimiento por un factor comprendido entre 15 y 25.

Ejemplo 8: Evaluación de la toxicidad de las nanocápsulas obtenidas por el procedimiento de transacilación

30

La toxicidad de las nanocápsulas lipídicas modificadas por el procedimiento de transacilación se ha evaluado utilizando el ensayo con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

35 Este ensayo pretende medir la toxicidad de las nanopartículas midiendo la viabilidad relativa de las células expuestas a las nanopartículas tomando como control unas células no tratadas por unas nanopartículas.

El anillo del tetrazolio que contiene el reactivo MTT es reducido a formazán por la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas activas.

40 El color del medio pasa entonces del amarillo al azul-violáceo, siendo la intensidad de esta coloración proporcional al número de células vivas presentes durante el ensayo pero también a su actividad metabólica.

45 Para este ensayo, se puede hacer referencia a los ensayos descritos en los documentos "Mosmann T, Journal of immunological methods 65 (1-2): 55-63, diciembre de 1983", y "Cory *et al.*, Cancer communications 3 (7): 207-12, julio de 1991".

Este ensayo se ha realizado en una línea celular humana y tumoral, unas células U87MG (HTB-14, LGC estándar).

50 Para asegurar una buena significatividad estadística del ensayo, cada ensayo se ha realizado por quintuplicado.

Los resultados obtenidos se indican en la figura 5.

55 Para cada gráfico, la fiabilidad celular relativa se expresa en función de la concentración de las nanocápsulas modificadas o no. Se utilizan como referencia unas células U87MG no tratadas por unas nanopartículas. El valor obtenido para estas células representa una fiabilidad celular del 100%.

Se puede observar que, de manera general, las nanocápsulas modificadas durante la etapa de transacilación presentan unos perfiles de toxicidad comparables al perfil de las nanocápsulas de partida.

A la vista de los resultados obtenidos, el injerto de polímeros naturales o sintéticos no provoca toxicidad adicional.

En efecto, se ha observado que las nanocápsulas obtenidas por transacilación no muestran ninguna toxicidad para concentraciones inferiores a 1/300 de la suspensión inicial.

Ejemplo 9: Desarrollo de estructuras en multicapas alrededor de nanocápsulas lipídicas modificadas por transacilación

En 2 ml de suspensión de LNC de 50 nm obtenidos según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se ha realizado una transacilación a 25°C mediante el uso de 40 µl de una solución al 5% de poli-L-lisina (PLL) durante 15 minutos. La mezcla se neutraliza después mediante la adición de 2 ml de tampón glicina 0,5 M a pH 2,2.

Después de la diálisis frente a agua milliQ, se ponen en contacto 50 µl de LNC transaciladas con 0,045 nanomoles de ARNsi, después se diluyen con 2,95 ml de agua milliQ. La totalidad de los ARNsi se fija entonces sobre las LNC. La concentración en ARNsi es de 15 nanomoles por litro.

Aparece un aumento del diámetro hidrodinámico de las partículas, así como una inversión de su potencial zeta, confirmando así la adsorción de los ARNsi sobre las LNC.

Una capa de polímeros (poli-L-lisina) es consecutivamente adsorbida sobre las LNC según el protocolo siguiente.

Se añaden 5 µl de solución de polilisisina con el 5% a la suspensión de LNC-ARNsi para formar unos sistemas LNC-ARNsi-PLL, que pueden ser entonces purificados por diálisis contra una solución de NaCl 10 mM.

Las LNC así obtenidas tienen un potencial zeta positivo, lo que demuestra así la adsorción del polímero en una estructura multicapas.

Ejemplo 10: Fijación de proteínas modelos sobre unas nanocápsulas modificadas por transacilación

Este estudio consiste en la adsorción de proteínas o de ácidos nucleicos fluorescentes sobre las LNC modificadas.

1) Proteína fluorescentes BSA-FITC

Se han realizado unos experimentos con BSA-FITC a diferentes concentraciones: 0,5 mg/ml, 0,33 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,2 mg/ml, y 0,1 mg/ml.

Estas proteínas marcadas con FITC se obtuvieron según el protocolo siguiente.

Se mezclan 900 µl de una solución de BSA a 2,77 mg/ml en bicarbonato de sodio 0,1 M a un pH igual a 9, a 250 µl de una solución de FITC a 4 mg/ml en dimetilsulfóxido, siendo la reacción dejada bajo agitación protegida de la luz a 25°C durante 2 horas. Se separan después las proteínas marcadas del FITC que no ha reaccionado, por cromatografía de exclusión estérica sobre gel de Sephadex G-25®.

La cantidad de proteína así como la cantidad de FITC fijada sobre las proteínas son después ensayadas según el protocolo siguiente.

Se han realizado un rango de referencia de BSA y un rango de referencia de FITC en PBS 5 mM, siendo la absorbencia medida a 280 nm para la BSA, y a 490 para el FITC.

Las absorbencias a 280 nm y 490 nm de la solución de proteínas marcadas son después medidas y comparadas con los rangos de referencias a fin de determinar las concentraciones respectivas en BSA y en FITC. Se puede calcular entonces la relación concentración en FITC sobre concentración en BSA.

Se procede después a la etapa de complejación entre LNC transaciladas y las proteínas fluorescentes según el protocolo siguiente.

Para obtener los valores de fluorescencias I_0 , se miden la fluorescencia y las intensidades de fluorescencia de soluciones de BSA-FITC de concentraciones conocidas. Después, se realizan las mismas soluciones de BSA-FITC en presencia de concentraciones crecientes de nanocápsulas transaciladas. Las fluorescencias e intensidades de fluorescencia de estas soluciones son entonces también medidas (I).

Comparando la relación $(I-I_0)/I_0$ para cada concentración en LNC modificadas, se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia con el aumento de la concentración en LNC modificadas.

Los resultados de medición de fluorescencia obtenidos son representados en la figura 6.

5 Cuando se realizaron unos experimentos similares con unas LNC no previamente transaciladas, no se observó ninguna variación de la intensidad de fluorescencia.

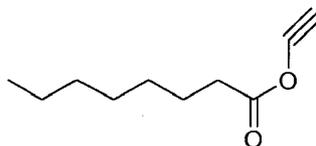
2) ARNsi-FITC

10 Se han llevado a cabo los mismos experimentos con, en lugar de BSA-FITC, unas ARNsi-FITC. Se observa una misma disminución de la intensidad de fluorescencia con el aumento de la concentración en LNC modificadas.

Los resultados de medición de fluorescencia obtenidos con ARNsi-FITC se representan en la figura 7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cápsula de tipo núcleo lipídico líquido/corteza lipídica sólida funcionalizada en la superficie con al menos un compuesto que contiene al menos una función amina, caracterizada por que la estructura núcleo/corteza lipídicos está a escala nanométrica y por que dicho compuesto está unido de manera covalente por medio de una reacción de transacilación a dicha corteza lipídica sólida.
- 10 2. Cápsula según la reivindicación anterior, en la que el compuesto aminado injertado en la superficie de esta está por otro lado unido de manera no covalente a una molécula de interés.
- 15 3. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto aminado y/o la molécula de interés es de naturaleza proteica, peptídica, nucleica, polimérica o inorgánica, incluso organometálica.
- 20 4. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto aminado es una proteína seleccionada en particular entre la albúmina, la gelatina, los polipéptidos, en particular el ácido poliaspártico, la poliarginina, la polilisina o un polímero sintético, en particular un polietileno imina.
- 25 5. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el compuesto aminado y/o la molécula de interés es una molécula de ácido nucleico, en particular un ARNsi.
- 30 6. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya corteza lipídica comprende al menos un tensioactivo liposoluble.
- 35 7. Cápsula según la reivindicación anterior, en la que el tensioactivo liposoluble se selecciona entre los fosfolípidos, las lecitinas y las fosfatidilcolinas.
- 40 8. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya corteza lipídica sólida está formada de al menos un sistema tensioactivo que comprende un tensioactivo lipófilo y, además, un tensioactivo termosensible, no iónico e hidrófilo.
- 45 9. Cápsula según la reivindicación anterior, en la que el tensioactivo termosensible, no iónico e hidrófilo se selecciona entre los fosfolípidos, los ésteres de ácido graso de sorbitol polietoxilados, los ésteres de polietilenglicol de ácido graso, unos ácidos grasos de sorbitol polietoxilados, los ésteres de polietilenglicol de ácido graso, unos ácidos grasos polietoxilados, unos éteres de alcohol graso polioxi-etilenados, unos éteres no fenilo polioxi-etilenados, unos éteres hidroxifenilo polioxi-etilenados y un 2-hidroxiestearato de polietilenglicol.
- 50 10. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya corteza comprende además al menos un éster de alcohol.
- 55 11. Cápsula según la reivindicación anterior, en la que el éster de alcohol se selecciona entre los ésteres de alcohol cuyo número de carbono es un número entero inferior o igual a 12, más particularmente inferior o igual a 10, aún más particularmente inferior o igual a 8.
- 60 12. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en la que el éster de alcohol corresponde a la fórmula siguiente:



- 50 13. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la reacción de transacilación está establecida entre al menos un tensioactivo liposoluble, presente en la corteza lipídica, y al menos un compuesto que contiene al menos una función amina.
- 55 14. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto aminado está injertado en superficie de esta por medio de un procedimiento de transacilación a partir de una lecitina, presente en la corteza lipídica.
- 60 15. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la reacción de transacilación está establecida entre al menos un éster de alcohol, presente en la corteza, y al menos un compuesto que contiene al menos una función amina.
- 60 16. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el núcleo lipídico líquido comprende al

menos una fase grasa oleosa formada de al menos un cuerpo graso líquido o semilíquido, en particular de al menos un triglicérido, de un éster de ácido graso, o de una de sus mezclas.

5 17. Cápsula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya estructura núcleo/envoltura lipídicos a escala nanométrica encapsula al menos un agente activo en el núcleo y/o en la corteza.

18. Procedimiento útil para la funcionalización de nanocápsulas de corteza lipídica sólida y núcleo lipídico líquido, comprendiendo dicho procedimiento al menos las etapas que consisten en:

10 i) disponer de nanocápsulas de corteza lipídica sólida y núcleo lipídico líquido,

ii) poner en contacto dichas nanocápsulas con una solución acuosa alcalina, a fin de activar su superficie para una reacción de transacilación,

15 iii) poner en contacto el medio ii) con al menos un compuesto que contiene al menos una función amina para formar, por transacilación, dichas cápsulas esperadas y, llegado el caso,

iv) neutralizar las cápsulas funcionalizadas así obtenidas, y

20 v) aislar dichas cápsulas funcionalizadas.

19. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que el compuesto aminado es un compuesto seleccionado entre los mencionados en las reivindicaciones 3 a 5.

25 20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 18 o 19, en el que la reacción de transacilación utiliza una alcalinización por una solución de sosa.

21. Cápsulas susceptibles de ser obtenidas mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 18 a 20.

30 22. Utilización de al menos una cápsula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para la preparación de una composición de interés terapéutico, cosmético o nutracéutico.

23. Composición que contiene al menos una cápsula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en asociación con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable.

35

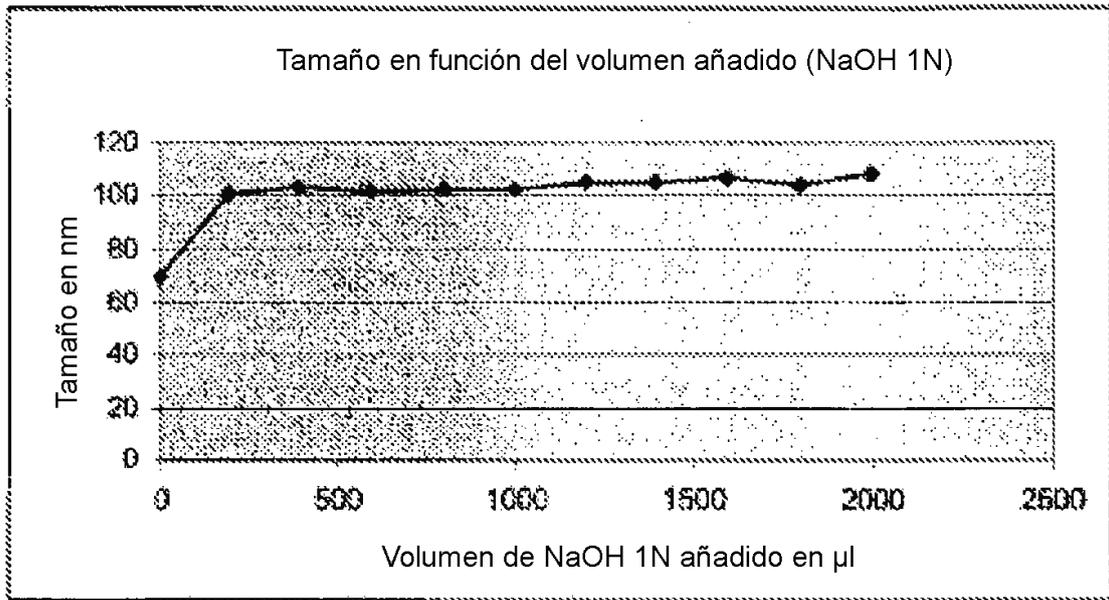


Figura 1

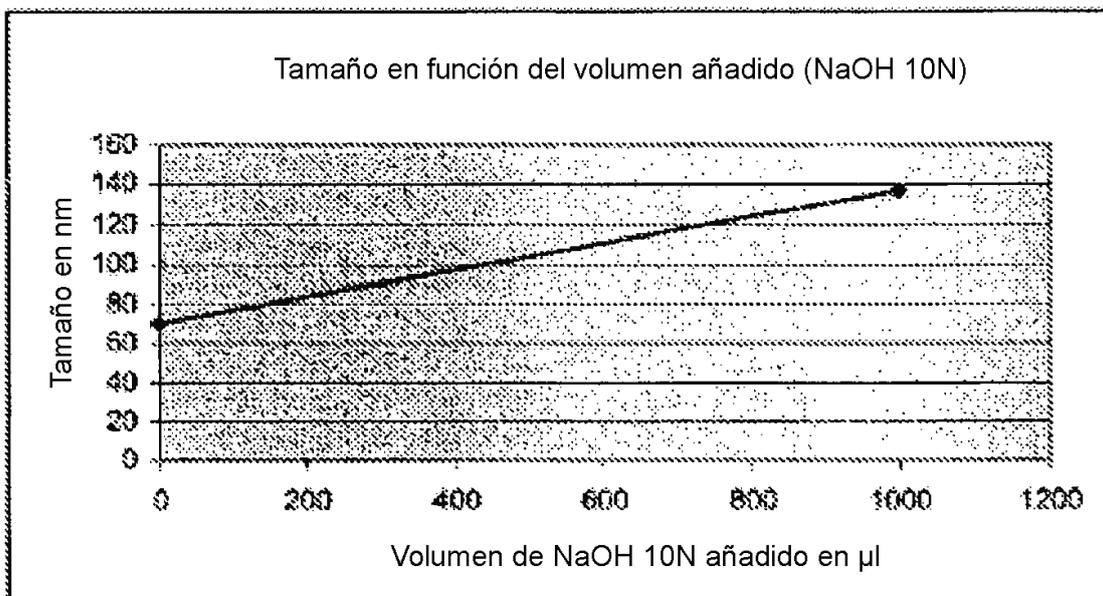


Figura 2

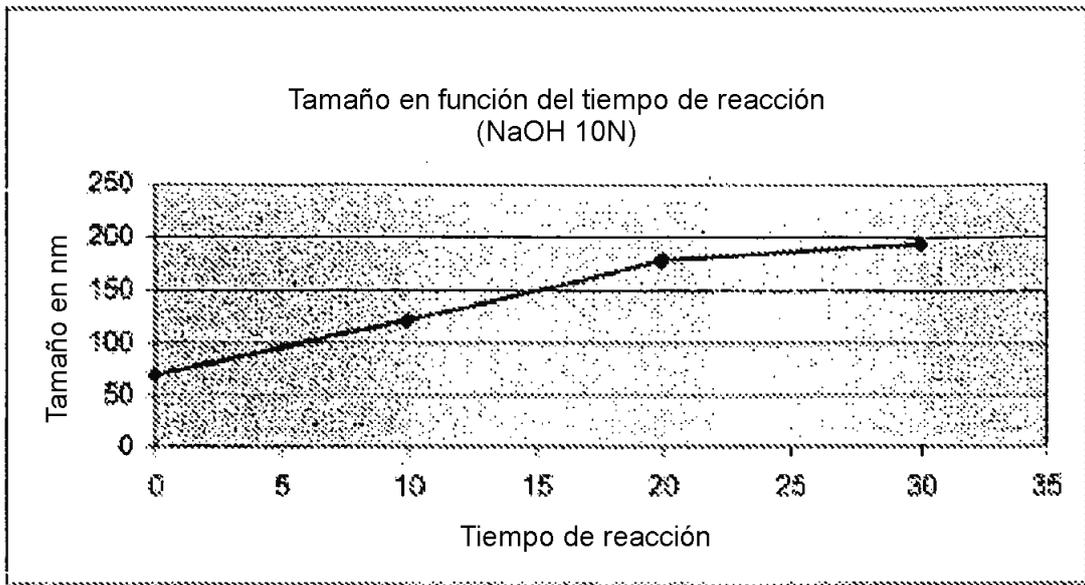


Figura 3

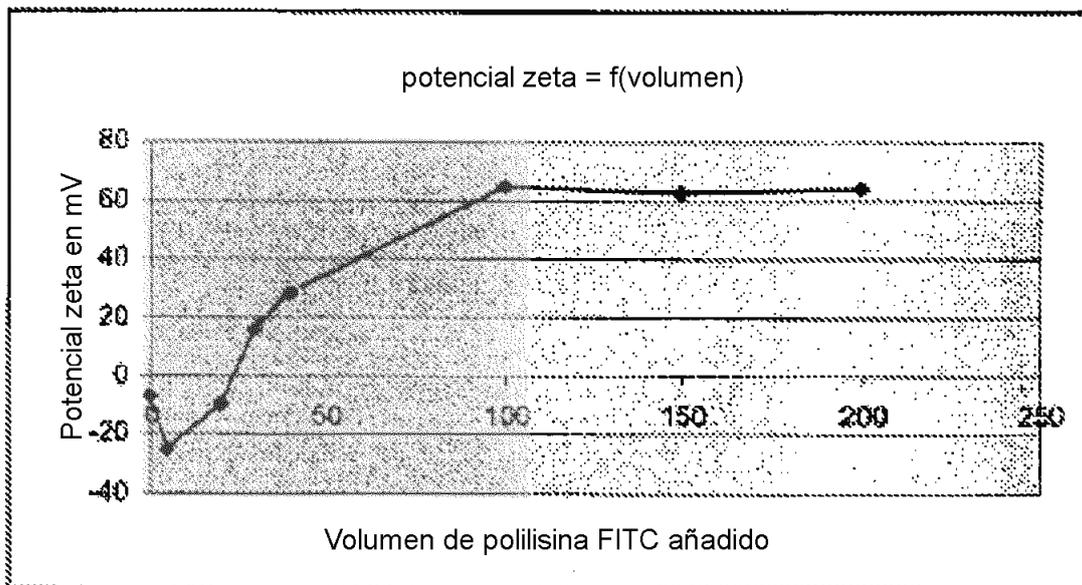


Figura 4

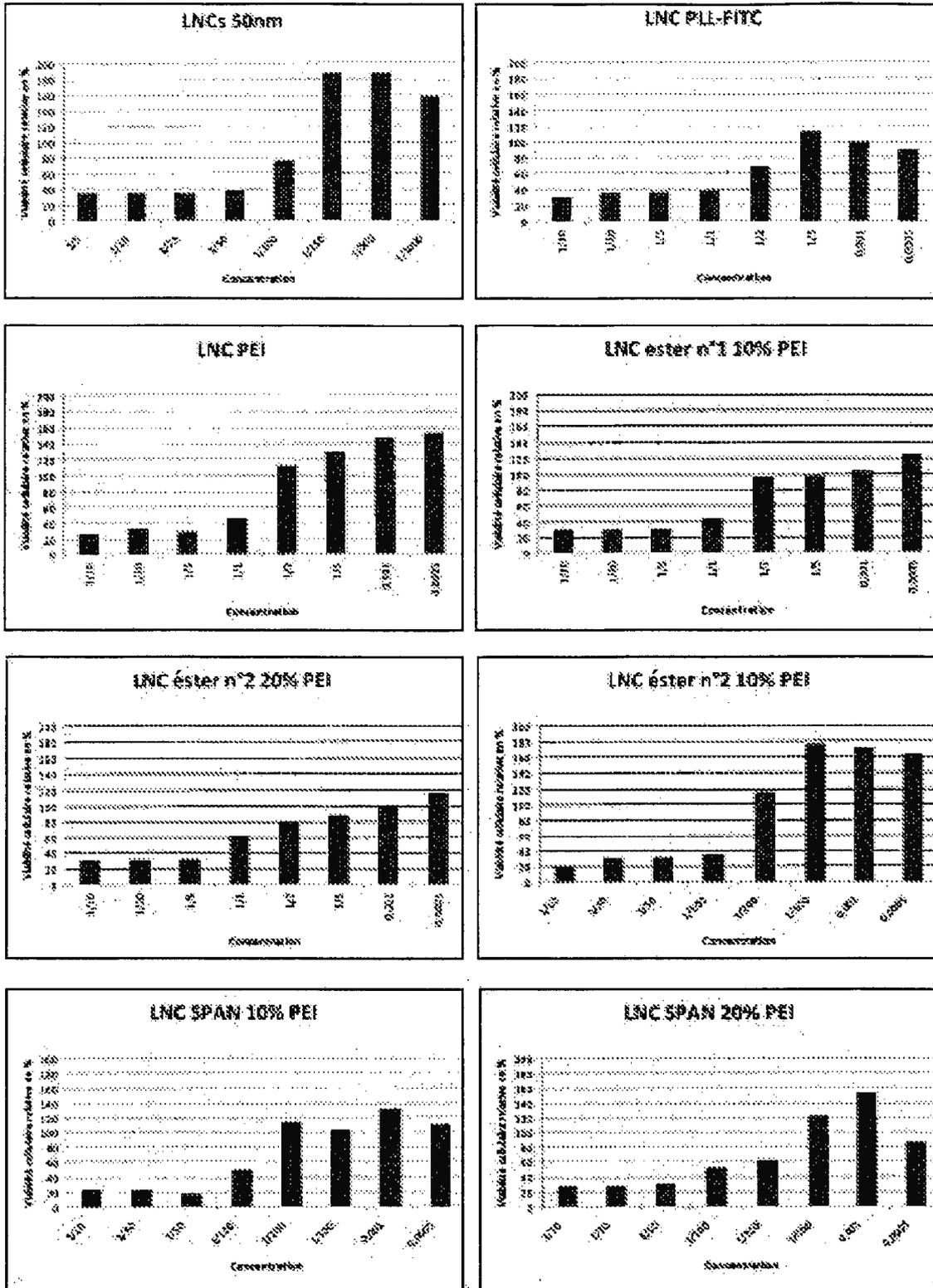


Figura 5

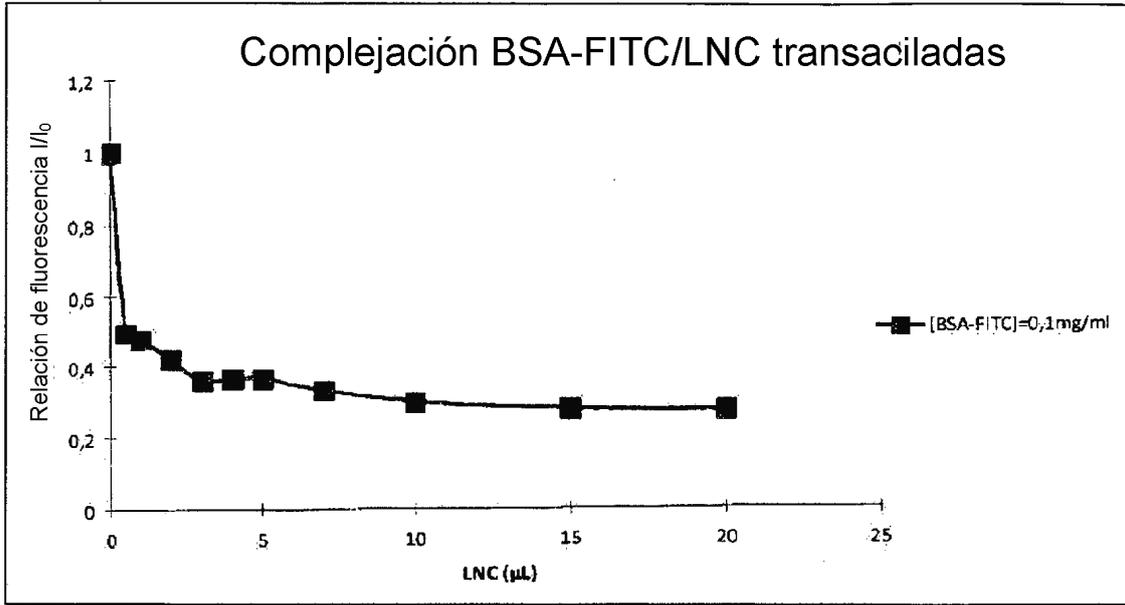


Figura 6

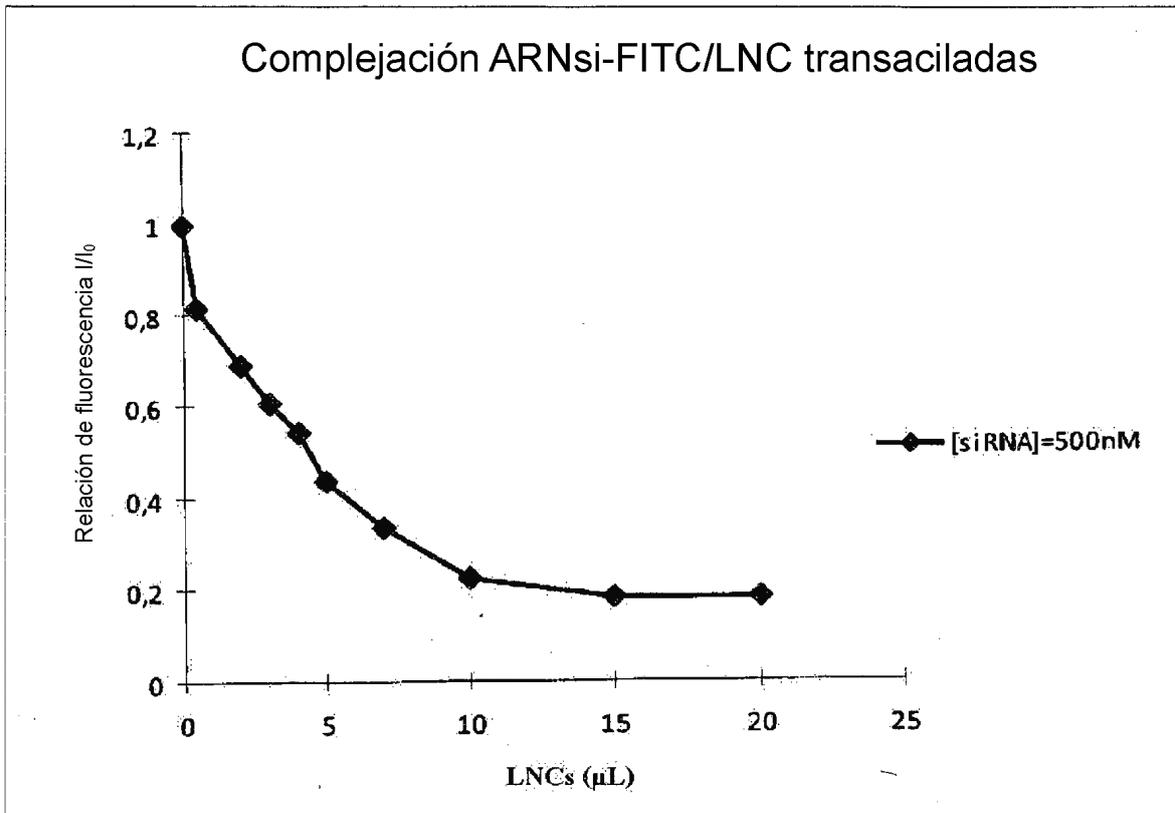


Figura 7