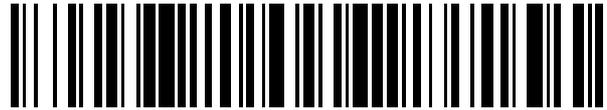


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 558**

21 Número de solicitud: 201530974

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

07.07.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.01.2017

Fecha de concesión:

19.01.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

26.01.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca (Salamanca) ES**

72 Inventor/es:

**DE JESÚS VALLE, María José y
SÁNCHEZ NAVARRO, Amparo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **LIPOSOMAS RECUBIERTOS CON ALBÚMINA**

57 Resumen:

Liposomas recubiertos con albúmina.

La presente invención se refiere a la preparación de partículas por micro-encapsulación con albúmina de liposomas de diferente composición y potencial zeta en ausencia de disolventes orgánicos y sin necesidad de condiciones extremas de temperatura y/o presión, útiles como vehículos transportadores de principios activos con potencial interés en el ámbito de la medicina.

ES 2 596 558 B1

LIPOSOMAS RECUBIERTOS CON ALBÚMINA

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a partículas esféricas constituidas por liposomas recubiertos con albúmina y su procedimiento de obtención basado en la floculación inducida por atracción electrostática. Las partículas resultantes pueden encapsular un amplio abanico de principios activos o moléculas, haciendo de las mismas un sistema útil como vehículo transportador versátil, biocompatible y biodegradable para la liberación controlada de fármacos y/ o agentes de diagnóstico.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Con la irrupción de la nanotecnología y los grandes avances en las ciencias de biomateriales, se proponen sistemas de liberación controlada de fármacos cada vez más sofisticados que persiguen objetivos diversos, entre los que se incluyen la vectorización junto con la liberación selectiva del principio activo en respuesta a señales biológicas.

20 Así, las formulaciones multifuncionales que combinan diferentes materiales como son los lípidos, proteínas, oligosacáridos y polímeros sintéticos constituyen un continuo objeto de estudio. En este sentido, los liposomas son actualmente uno de los sistemas más prometedores en este campo y numerosas estrategias basadas en la selección de los componentes de la bicapa lipídica están siendo ensayadas para conseguir una liberación controlada y restringida a la biofase (Qian *et al. Journal of Controlled Release*, **2015**, 207(10), 86–92; Movahedi *et al. Nanomedicine*, **2015**, 11(6), 1575–1584), así como para la formulación de vacunas.

30 Por otro lado, debido a que la estabilidad de los liposomas en el torrente circulatorio es baja por su interacción con los diferentes componentes plasmáticos, se buscan estrategias de estabilización, siendo la pegilación la más aplicada hasta el momento, aunque también es cierto que las moléculas de PEG pueden acumularse en algunas células alterando sus funciones (Romberg *et al., Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16(4), 767–774). Por este motivo se trata de sustituir el PEG por otros productos como son

35 albúmina, heparina, chitosán o ácido hialurónico.

La albúmina, molécula hidrófila con un punto isoeléctrico de aproximadamente 5, es la proteína plasmática más abundante en los mamíferos, con funciones fisiológicas importantes en cuanto a la regulación de la presión coloidosmótica y el transporte de numerosos solutos (ácidos grasos, hormonas, ácidos biliares, aminoácidos, metales, etc.) desde el torrente circulatorio a los tejidos. Además, parece que la albúmina facilita la transcitosis endotelial de determinados componentes plasmáticos debido a su unión a un receptor de membrana (albodina) con la consiguiente formación de vesículas llamadas caveolas. Por otro lado parece que la albúmina está implicada en la distribución tisular selectiva de determinados fármacos a los cuales protege de fenómenos de oxidación, a la vez que influye en el perfil cinético de los mismos (Feng *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15(3), 3580-3595; Mita *et al.*, *Invest New Drugs*, **2015**, 33, 341–348).

Estas propiedades, junto con su mayor captación y acumulación en tejidos tumorales, inflamados e infectados, hace de la albúmina un buen candidato a incluirse en formulaciones que buscan una liberación selectiva en los tejido afectados por los procesos citados, especialmente si presentan baja solubilidad acuosa (Krazt *et al.*, *J. Control. Release*, **2008**, 132(3), 171–183).

En este sentido, nanopartículas de albumina bovina han demostrado ser eficaces en la incorporación de determinados colorantes, fármacos y agentes vectorizantes. Para antineoplásicos la albúmina se presenta como un excelente componente de la formulación ya que se trata de un producto con un peso molecular adecuado para beneficiarse del efecto EPRE (*enhanced permeability and retention effect*) descrito en tejidos tumorales. El primer medicamento comercializado en oncología basado en nanopartículas de albúmina fue el Abraxane® con indicación para el tratamiento del cáncer de mama; consiste en nanopartículas de 130nm constituidas por albúmina humana y paclitaxel. Esta tecnología patentada como *nab-technology* promete una amplia aplicación para otros fármacos análogos al paclitaxel. En la actualidad se estudia para el docetaxel y el lapatinib un inhibidor de la tirosin-kinasa aprobado para su utilización, junto con capecitabina, para el tratamiento del cáncer en pacientes con expresión del receptor de crecimiento epidérmico HER2. Lapatinib incorporado a partículas de albúmina obtenidas con *nab-technology* ha demostrado una eficacia antitumoral superior a la formulación actualmente comercializada (Wan *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics*, **2015**, 484(1-2), 16-28). También se ha conseguido la incorporación de doxorubicina y tacrolimus a nanopartículas de

albúmina; en el primer caso, mediante un procedimiento sencillo de co-precipitación se consiguen partículas que liberan más cantidad de antineoplásico en el tumor por un mecanismo de vectorización pasiva. Para tacrolimus el procedimiento aplicado es más complejo e implica la formación de emulsiones y su posterior homogenización por
5 altas presiones (Zhao et al., *Pharmaceutical Nanotechnology*, **2015**, 483(1-2), 180-187), pero consigue disminuir significativamente la nefrotoxicidad del producto.

En lo que se refiere a la combinación de liposomas y albúmina, hasta el momento esta estrategia se ha explorado fundamentalmente en el campo de la inmunología,
10 utilizando la albúmina como agente adyuvante. Las estrategias descritas en la literatura se asemejan a la pegilación ya que se basan en la unión covalente de la albúmina a algún componente de la bicapa del liposoma, para lo cual es preciso modificar la estructura molecular de la albúmina. Así, albúmina bovina tiolada se une covalentemente a la butiril-fosfatidiletanolamina que forma parte de las vesículas
15 lipídicas y el producto resultante demostró una alta eficacia para potenciar la respuesta inmunológica. Cuando se evaluó la respuesta inmunológica a ovoalbúmina tiolada covalentemente unida a liposomas que contenían doxorubicina no se produjo lo observado con liposomas vacíos debido a que doxorubicina inhibe la actividad de las células fagocíticas en el hígado. Esto confirma que la albúmina modificada no es
20 inerte y desencadena procesos inmunes no deseados si se pretende utilizar como excipiente de formulaciones que no son vacunas. Apenas hay datos sobre la combinación de albúmina y liposomas para la formulación de fármacos y ninguno utiliza albúmina nativa, no modificada; los estudios publicados se refieren a la utilización de albúmina desnaturalizada para recubrir liposomas pegilados o no
25 pegilados que contienen doxorubicina o el oligonucleótido antisentido G3139 y ambos coinciden en afirmar las ventajas de incorporar la albúmina a la formulación.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, hasta el momento no se han descrito ni aplicado métodos de recubrimiento de liposomas con albumina sin modificar mediante
30 un fenómeno de floculación inducida, consiguiendo un vehículo de uso farmacéutico versátil, biocompatible, biodegradable e inocuo. En el presente documento se describe, además, el método de preparación de estas partículas consistentes en liposomas encapsulados con albumina, basado en la inducción de fenómenos de floculación, que transcurre en ausencia de disolventes orgánicos, a presión
35 atmosférica y sin elevadas temperaturas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se ha diseñado, formulado y caracterizado unas partículas esféricas que comprenden al menos un liposoma, de distinta composición y/o potencial zeta, recubiertos de albúmina, susceptibles de contener diferentes principios activos, u otras moléculas o productos. Sus características varían según las condiciones experimentales aplicadas durante el proceso de producción, que se lleva a cabo en ausencia de disolventes orgánicos y sin necesidad de condiciones extremas de temperatura y/o presión, aunque este procedimiento no es limitante y también podría aplicarse a liposomas obtenidos por cualquier otro método.

Se prepararon productos sin principio activo y cargados con diferentes principios activos, como por ejemplo vancomicina y ciprofloxacino. El primero, un glicopéptido de estructura compleja con efecto bactericida, se seleccionó como modelo de fármaco hidrosoluble con moderada afinidad por la albúmina y se estudió el perfil cinético de liberación de vancomicina *in vitro* mediante ensayos de diálisis. El segundo, un antibiótico del grupo de las quinolonas, con características físico-químicas muy diferentes a la vancomicina en lo que se refiere a peso molecular (331,34 g/mol para ciprofloxacino frente a 1449,25 g/mol para vancomicina) y carácter ácido-base (pKa= 6,03 para ciprofloxacino frente al carácter diprótico de vancomicina con pKa= 2.99 y pKa= 9,93), también se incorpora a los liposomas y forma partículas esféricas cuyo tamaño, potencial zeta y contenido en principio activo dependen de las condiciones experimentales en las que se realiza el proceso.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que las partículas propuestas constituyen unos vehículos transportadores biocompatibles, biodegradables e inocuos, y de gran versatilidad en cuanto a tamaño, potencial zeta y contenido en principios activos, lo que les confiere un elevado potencial para la formulación de agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y vacunas.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una partícula esférica formada por un núcleo recubierto de albúmina mediante interacción electrostática, donde dicho núcleo comprende al menos un liposoma que puede ser aniónico o catiónico de potencial zeta comprendido entre +90mV y - 90mV.

Por el término “liposoma” se entiende una vesícula esférica en la que se diferencian un núcleo acuoso y al menos una membrana compuesta de una doble capa de lípidos anfifílicos, también llamada bicapa lipídica, que incluye partes hidrofílicas y lipofílicas.

- 5 Los liposomas pueden ser uni-, oligo- o multilamelares, es decir que pueden comprender una o varias dobles capas de lípidos. Si bien los propios de la invención, los más adecuados y preferidos para su aplicación tópica son los unilamelares.

- 10 Por el término “albúmina” se entiende, forma general, a albúmina de tipo nativo o recombinante de mamífero. Más preferiblemente, la albúmina es de origen humano, bovino (BSA), murino, o de conejo; otras albúminas de posible utilización son la ovoalbúmina y la lactoalbúmina. Aún más preferiblemente, la albúmina utilizada es albúmina sérica humana, recombinante, o albúmina sérica bovina fresca o liofilizada.

- 15 En una realización preferida la partícula tiene un tamaño micrométrico con un diámetro de partícula comprendido entre 0,1 μ m y 100 μ m, preferiblemente entre 0,2 μ m y 1 μ m.

- 20 En una realización preferida la partícula tiene tamaño nanométrico con un diámetro de partícula comprendido entre 0,1nm y 100nm.

En otra realización preferida la albúmina es albúmina no modificada de origen humano.

- 25 En otra realización preferida los lípidos constituyentes de la bicapa lipídica del liposoma incluyen: a) fosfolípidos, tanto de origen natural como sintético como por ejemplo fosfatidilcolina, o colesterol y b) otro lípido con carga iónica, es decir, cargado positiva o negativamente; o cualquiera de sus mezclas.

- 30 Entre los lípidos con carga iónica preferidos se encuentran, por ejemplo, el dimetildioctadecilamonio, el ácido linoleico y el fosfatidilglicerol, entre otros.

- 35 En otro aspecto de la invención, la partícula esférica comprende una molécula o un principio activo encapsulado en el liposoma, o atrapado en la cubierta de albúmina, o encapsulado en el liposoma y atrapado en la cubierta de albúmina.

Como se emplea aquí, el término “principio activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Los principios activos preferidos se seleccionan de entre la siguiente lista, no limitante, de: antifúngicos (anfotericina, fluorocitosina, itraconazol, posaconazol, caspofungina, anidulafungina, micafungina, isavuconazol, aminocandina, entre otros), antibióticos (ciprofloxacino, vancomicina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, penicilinas y cefalosporinas, rifampicina, isoniazida y estreptomina, quinolonas, entre otros), progestágenos (etinilestradiol, norelgestromina, levonorgestrel, drospirenona, norgestimato, entre otros), antineoplásicos (doxorubicina, epirrubina, dactinomicina, paclitaxel, docetaxel, lapatinib, capecitabina, tegafur, metotrexato, entre otros), antiretrovirales: (efavirenz, atazanavir, sofosbuvir, daclastavir, ledipasvir, ombitasvir, entre otros), analgésicos y antiinflamatorios (por ejemplo antiinflamatorios no esteroideos, triptanes (por ejemplo eletriptan o almotriptan)), inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (por ejemplo celecoxib), derivados del oxicam (por ejemplo piroxicam) derivados pirazólicos (por ejemplo fenilbutazona), agentes de diagnóstico, material paramagnético, etc.

En una realización preferida se prepararon compuestos cargados con vancomicina y ciprofloxacino.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende la partícula esférica de la invención, siendo esta composición preferiblemente farmacéutica o cosmética. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica o cosmética comprende, además, excipientes farmacéutica o cosméticamente aceptables.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la administración de cualquiera de los componentes del producto de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica o cosmética en el sentido de darle consistencia y así estabilizar la suspensión. Así pues, los

excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de olorizar o desodorizar, función de colorante, función de protección del medicamento, función de liofilización del medicamento o cosmético, entre otras. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para ayudar a su administración, penetración en la piel o faneras, posibilitar su preparación o formulación y estabilizarla, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “cosmética o farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición, es decir, que sea compatible con dichos componentes. Ejemplos de excipientes son isotonzantes, reguladores del pH, aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, saborizantes o aromas y colorantes. Ejemplos más concretos no limitantes de excipientes farmacéutica o cosméticamente aceptables son almidones, azúcares, ácido hialurónico, xantanas, glicerol, xilitol, sorbitol, o glicerina entre otros.

Además, la composición puede comprender diversos antioxidantes, como vitamina E, vitamina A y vitamina C, que principalmente proporcionarían un efecto estabilizante químico de la composición.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las partículas de la invención como vehículo transportador, preferiblemente para la liberación controlada de fármacos y particularmente de principios activos no hidrosolubles.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las partículas de la invención para la elaboración de un medicamento, productos teranósticos o vacunas, preferentemente para el tratamiento del cáncer, VIH y Hepatitis C.

Asimismo, gracias a que los compuestos descritos presentan tres depósitos diferenciados: núcleo acuoso de los liposomas, bicapa lipídica de los liposomas y proteína con capacidad de unión y transporte, cada uno de ellos capaz de albergar principios activos de diferente solubilidad y afinidad, lo que resulta interesante para la elaboración de un medicamento para el tratamiento en terapias combinadas.

Además, el vehículo descrito en la presente invención podría aplicarse a la formulación de medicamentos susceptibles de aplicarse de acuerdo con el siguiente listado, no limitante:

- 5 - Administración oral: para fármacos con solubilidad acuosa baja para los que la formulación convencional exige trabajar con disolventes orgánicos y/o incorporar tensoactivos y otros excipientes solubilizantes no inocuos.
- 10 - Administración trans-mucosa: la interacción de la albúmina con la mucina presente en las secreciones mucosas favorece la mucoadhesión y cesión prolongada del fármaco, lo que presenta especial interés para las vías: pulmonar, para vectorización pasiva de fármacos cuya biofase se sitúa en el sistema respiratorio (antibióticos, antineoplásicos, antiinflamatorios); bucal, para la vectorización pasiva de fármacos cuya biofase se sitúa en cavidad bucal (antibióticos, antifúngicos, antineoplásicos, antiinflamatorios); nasal, para vacunas; vaginal, para el tratamiento y profilaxis de infecciones vaginales, (antibióticos, antifúngicos, antineoplásicos, antiinflamatorios);
15 rectal (antibióticos, antifúngicos, antineoplásicos, antiinflamatorios); ocular (antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios).
- Transdérmica.
- Vías parenterales: las exigencias de tamaño se consiguen controlando las condiciones del proceso en concreto el potencial zeta de la vesícula y la cantidad
20 de albumina incorporada al compuesto. Dentro de las vías parenterales destacar: la intravenosa, especialmente para antineoplásicos y antibióticos por la capacidad de la albumina de acumularse en tumores y tejidos infectados; intramuscular, intradérmica y subcutánea (vacunas y otros).
- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de las partículas de la invención que comprende poner en contacto una suspensión de liposomas con una disolución de albúmina mediante floculación a un pH de entre 4 y 8, según la carga neta del liposoma.
- 30 En una realización preferida, a un volumen fijo de la suspensión de liposomas, en agua o solución tamponante, se añade igual volumen de disolución de albúmina, en agua o solución tamponante, de concentración comprendida entre 0,05 y 30%. En una realización más preferida la concentración de albúmina es del 1%.

En otra realización preferida, la etapa de floculación se induce a pH de entre 3 y 5 cuando se parte de liposomas con potencial zeta negativo y se induce a pH de entre 5 y 8 cuando se parte de liposomas con potencial zeta positivo.

5 En otra realización preferida, la solución tamponante comprende preferentemente sales de fosfato o citrato.

En otra realización preferida los vehículos transportadores obtenidos por el método descrito, se recubrieron con albumina bovina de origen humano mediante un
10 fenómeno de floculación en medio acuoso, presión atmosférica (aproximadamente 1 atmósfera) y temperatura comprendida entre 2 y 10°C. En una realización más preferida esta temperatura de floculación es de 4°C.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus
15 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1-4 Morfología de liposomas recubiertos por albúmina obtenida por microscopia electrónica de barrido (SEM) de distinto tamaño.

25

FIG. 5. Cinética de liberación *in vitro* de vancomicina. Resultados de los estudios realizados con los compuestos preparados a partir de liposomas catiónicos. Se ilustran las cantidades cedidas (miligramos) a distintos tiempos para un período de 48 h.

30

FIG. 6. Análisis de las curvas de cantidades remanentes en compuestos. Muestra que el proceso cinético de liberación del fármaco (vancomicina) es de naturaleza poliexponencial en todos los casos, independientemente de la cantidad de albúmina y principio activo incorporado.

EJEMPLOS

5 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1**Preparación de liposomas**

10 Los lípidos constituyentes de la bicapa lipídica del liposoma se mezclan con agua Milli-Q previamente calentada a 60°C, agitando la mezcla hasta dispersión de los lípidos y seguidamente se colocan en baño de ultrasonidos (50 Hz) durante 20 min a $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Los liposomas, cuya composición incluye fosfatidilcolina de huevo, colesterol y un lípido con carga iónica (dimetildioctadecilamonio, ácido linoleico o fostatidilglicerol), se
15 prepararon en todo caso a partir de la misma concentración de lípidos en agua (1,73% p/v).

La sonicación directa de la mezcla de lípidos y agua permite obtener liposomas sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos, tal como se demostró en un trabajo
20 previo realizado con liposomas sin lípidos iónicos. Los liposomas catiónicos y aniónicos preparados presentaron valores medios de diámetro hidrodinámico de 56,98nm (PDI= 0,29) para los catiónicos y de 50,84nm (PDI= 0,24) para los aniónicos. El potencial zeta resultó ser de $+61,9 \pm 2,08\text{mV}$ y $-47,95 \pm 4,71\text{mV}$, respectivamente.

Ejemplo 2**Preparación de liposomas cargados con principio activo**

Para obtener liposomas cargados con vancomicina se utilizó una disolución del principio activo (vancomicina o ciprofloxacino) de concentración 5 mg/mL. Las
30 muestras sonicadas se mantuvieron 1 h en reposo, a temperatura ambiente durante 60 min, para que se complete el proceso de ensamblaje de los lípidos y formación de las vesículas; seguidamente se filtraron a través de membrana de 0,22 μm . Se tomó una alícuota de la suspensión de liposomas para su caracterización (morfología, tamaño, potencial zeta y contenido en principio activo) y el resto se destinó a su
35 recubrimiento con albumina para la formación de los vehículos transportadores.

La eficacia de captación de principio activo en los liposomas fue del 15 % en los catiónicos y ligeramente inferior en los aniónicos para el caso de la vancomicina.

Ejemplo 3

5 **Preparación de los liposomas encapsulados**

Vesículas lipídicas de distinta composición y potencial zeta, obtenidas por el método descrito, se recubrieron con albumina bovina. A un volumen fijo de la suspensión de liposomas se añadió, por goteo, igual volumen de disoluciones de albúmina de distinta concentración (0,1-3%). Se indujo un fenómeno de floculación por atracción electrostática entre los liposomas y la albúmina, lo que exige el ajuste de pH a un valor inferior al punto isoeléctrico (pH=5) cuando se parte de liposomas con potencial zeta negativo. Las muestras resultantes se mantuvieron con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 15 min y posteriormente en baño de incubación a 4° C y agitación suave durante 20 h; transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm y 4°C y se separó el sobrenadante del pellet. Se midió el volumen de sobrenadante, se cuantificaron los niveles de albúmina y vancomicina y se investigó la presencia de liposomas. Del pellet se separó una alícuota para caracterizar las partículas formadas (morfología, tamaño, potencial zeta, y contenido en fármaco) y el resto se destinó al ensayo in vitro de cesión de vancomicina.

La centrifugación de las muestras floculadas permitió separar sin dificultad el pellet del sobrenadante; cuando se analizó este último por microscopia y DLS no se encontraron liposomas y el análisis de cuantificación de albúmina y vancomicina demostró que una pequeña fracción queda en el sobrenadante, incorporándose el resto a las partículas formadas.

30 **Ejemplo 4.**

Caracterización de liposomas y liposomas encapsulados

Morfología

Las suspensiones de liposomas y los pellet obtenidos se observaron al microscopio utilizando un equipo de microscopía óptica conectado a una cámara y software de captación de imágenes (*Canon remote capture*) y también con equipo de microscopía

electrónica de barrido (SEM), para lo cual las muestras se sometieron previamente a un proceso de fijación utilizando poli-L lisina y osmio como agentes de fijación.

Respecto a la morfología de los vehículos obtenidos, éstos presentan forma esférica y superficie lisa (Fig. 1-4). Además, se observó que el tamaño aumenta a medida que se incrementa la cantidad de albumina añadida, independientemente de que los liposomas de partida sean aniónicos o catiónicos.

Tamaño y potencial zeta

Se determinó el diámetro hidrodinámico (dh) e índice de polidispersión (PDI) de las partículas antes (liposomas) y después de su recubrimiento con albúmina (liposoma encapsulado) utilizando dos equipos, Mastersizer 2000, que analiza partículas de tamaño superior a 0,5 μm y otro Zetasizer nano ZN, que detecta y analiza las de tamaño inferior. Las determinaciones se realizaron a 25°C, con una función de correlación para un ángulo de 173° en el Zetasizer nano y 90° en el Mastersizer, aplicando la relación Stokes –Einstein para la determinación dh. Las muestras se diluyeron con agua Milli-Q hasta obtener el grado de oscuración óptimo para las determinaciones. Se registraron las curvas de distribución de intensidad y número y se analizaron para estimar el valor de dh y PDI. Así mismo se midió el potencial zeta de las partículas tanto liposomas de partida como de los vehículos obtenidos utilizando el equipo Zetasizer nano y aplicando la técnica M3-PALS que combina la "Velocimetría Láser Doppler" y "Phase Analysis Light Scattering-PALS".

Se observa que el potencial zeta de los vehículos transportadores resultantes toma diferentes valores que dependen de la carga inicial de los liposomas y de la cantidad de albumina incorporada en los mismos. Para los liposomas catiónicos la proporción de albumina incorporada disminuye ligeramente a medida que aumenta la cantidad añadida ($EE_{alb} = 9,2 \pm 1,05\%$, $9,02 \pm 1,82\%$ y $8,9 \pm 0,97$), aunque las diferencias no presentaron significación estadística ($p > 0,05$). Para éstos, la eficacia de incorporación de principio activo aumentó progresivamente a medida que aumenta la cantidad de albúmina incorporada a los vehículos ($EE_{van} = 37,87 \pm 8,01\%$, $45,9 \pm 4,24\%$ y $52,0 \pm 2,28\%$, respectivamente), presentando las diferencia significación estadística ($p < 0,05$).

Como se desprende de los valores mostrados en la siguiente tabla, para los liposomas aniónicos ni EE_{alb} ni EE_{van} resultaron ser dependientes de la cantidad de albúmina

añadida, al menos con las concentraciones de proteína y potencial zeta ensayados. En este caso EEvan, además de no cambiar con la albúmina, presenta valores superiores a los correspondientes a liposomas catiónicos (64,00±1,65 vs 52,06±2,28).

Carga liposoma	Albumina	EEalb (%)	EEvan (%)	Albumina (mg)	Vancomicina (mg)
+	1%	9,22±1.05	37.88±8.01	5,52 ±0.55	11.36 ±2.40
+	2%	9,08±1.82	45.90±4.24	10,9.2±2.18	13.77 ±1.27
+	3%	8,98±0.97	52.06±2.28	16,2±1.46	15.61 ±1.07
-	1%	8,8.0±0.62	64.00±1.65	5,28±0.32	19.20±0.36
-	2%	8,87±0.32	63.08±0.43	10,64±0.31	18.90±0.76
-	3%	8,81±0.64	63.00±1.31	15,78±0.67	18.90±0.24

5

Contenido en principio activo de los liposomas

Se coloca un volumen fijo (V) de la suspensión de liposomas en un saco de diálisis (cut-off 12-14k Da) que se suspende en 25 mL de agua Milli-Q previamente calentada a 37°C, en tubo cerrado sometido a agitación. Se toman muestras del medio externo, cada 15 min, reponiendo los volúmenes retirados con igual cantidad de medio fresco, hasta alcanzar el equilibrio de diálisis. Se realizaron ensayos paralelos en condiciones idénticas pero incluyendo el mismo volumen (V) de una disolución de vancomicina de concentración conocida (5 mg/mL) en el saco de diálisis, como referencia. La cantidad de vancomicina en los liposomas (Qlip) se determinó a partir de las concentraciones en equilibrio de principio activo en el dializado procedente de la referencia y los liposomas (Cer y Celip, respectivamente).

10

15

$$C^{\text{er}} = f (C \times V) / 25 + V$$

$$C^{\text{elip}} = f (C \times (V - V_{\text{lip}})) / 25 \times (V - V_{\text{lip}})$$

20

$$Q_{\text{lip}} (\text{mg}) = V_{\text{lip}} \times C$$

Donde f es la fracción de principio activo disponible para el intercambio de diálisis, C y V son la concentración de fármaco y el volumen dentro del saco de diálisis, respectivamente y Vlip es el volumen atrapado en los liposomas. La eficacia de

encapsulación de principio activo en los liposomas (EElip) se expresó como $100 \times (Q_{lip}/Q_i)$, donde Q_i es la cantidad inicial de vancomicina utilizada para la preparación de los liposomas.

5 *Composición de las micro-nanoesferas con los liposomas encapsulados*

La composición de las partículas formadas por la interacción entre los liposomas y la albúmina, inducida por las condiciones experimentales aplicadas, se determinó de forma indirecta a partir de la composición del sobrenadante separado por centrifugación de las muestras floculadas. Dado que la centrifugación permite separar perfectamente el pellet del sobrenadante, se asume que todos los componentes de la mezcla (liposomas, albúmina y vancomicina) que no se encuentran en el sobrenadante están el pellet (liposoma encapsulado). De acuerdo a esto, la cantidad de albúmina y vancomicina atrapada en los liposomas encapsulados (Q_{alb} y Q_{van} , respectivamente) se calculó de la siguiente forma:

$$15 \quad \begin{aligned} Q_{alb} \text{ (mg)} &= (Q_{alb})_i - (V_s \times C_{alb}) \\ Q_{van} \text{ (mg)} &= (Q_{van})_i - (V_s \times C_{van}) \end{aligned}$$

Dónde $(Q_{alb})_i$ and $(Q_{van})_i$ son las cantidades de proteína y principio activo inicialmente añadidas a las muestras floculadas, respectivamente; V_s el volumen medido de sobrenadante y C_{alb} and C_{van} las concentraciones de albumina y vancomicina medidas en el sobrenadante, respectivamente.

La eficacia de encapsulación de albumina y vancomicina en los liposomas (EEalb, EEvan, respectivamente) se expresó como el porcentaje atrapado de cada producto en las partículas.

$$25 \quad \begin{aligned} EE_{alb} \text{ (\%)} &= 100 Q_{alb}/(Q_{alb})_i \\ EE_{van} \text{ (\%)} &= 100 Q_{van}/(Q_{van})_i \end{aligned}$$

Ejemplo 5

30 **Cinética de liberación del principio activo desde los liposomas encapsulados**

La cesión de vancomicina de los liposomas encapsulados se caracterizó in vitro mediante un ensayo de diálisis, similar al aplicado para la determinación del contenido en principio activo de los liposomas. El pellet separado por centrifugación se dispersó en 1,5 mL de agua Milli-Q y se incluyó en un saco de diálisis (cut-off 12-14k Da) que, a su vez, se suspendió en 25 mL de agua Milli-Q previamente calentada a 37°C en

tubo cerrado y sometido a agitación durante todo el ensayo. A tiempos previamente programados se tomaron muestras del medio externo, reponiéndose con igual volumen de medio fresco a la misma temperatura. Se midieron las concentraciones en las muestras y se calcularon las cantidades de principio activo cedidas a los diferentes tiempos (Q)tn como se indica a continuación:

$$(Q)_{tn} = (C_{tn} / f) \times 25 + \sum (C_{tn-1} \times 2) / f$$

Dónde Ctn es la concentración de principio activo en el dializado a tiempo tn, $\sum (C_{tn-1} \times 2)$ es la cantidad de fármaco retirada en las muestras anteriores y f es la fracción de principio activo que se intercambia a través de la membrana de diálisis.

Las curvas de cantidades remanentes de vancomicina en los liposomas encapsulados (Qr)tn se obtiene a partir de las diferencias entre la cantidad atrapada en los liposomas y las cantidad cedidas:

$$(Qr)_{tn} = Q_{van} - (Q)_{tn}$$

Dichas curvas se analizaron y se ajustaron a la siguiente ecuación poliexponencial utilizando un programa de regresión no lineal (Winnonlin) para el cálculo de coeficientes (Ai) y exponentes (Ri), considerando el criterio de AKAIKE para la selección del mejor ajuste de las curvas:

$$(Qr)_{tn} = \sum A_i e^{-R_i t}$$

Todo el procedimiento experimental descrito (desde la preparación de liposomas hasta la cinética de cesión in vitro) se realizó por cuadruplicado y los datos presentados son los valores medios de cuatro replicados.

Los resultados de los estudios realizados con los vehículos preparados a partir de liposomas catiónicos se muestran en la Fig. 5, que ilustra las cantidades cedidas a distintos tiempos para un período de 48h.

Se observan diferencias entre las cantidades totales cedidas por los vehículos con menor cantidad de albumina (Q48h= 6,57 ± 1,00 mg y EEvan= 37,87 ± 8,01%) y las de los otros de mayor EEalb (Q48h= 7,89 ± 0,38 mg y 7,99 ± 0,50 mg para EEvan= 45,9 ± 4,24% y 52,0 ± 2,28%, respectivamente), significación estadística (p<0,05). En ninguno de los casos se produce la liberación de todo el contenido de principio activo, a pesar de alcanzar el valor asintótico para las tres condiciones. Esto induce a pensar

que la cantidad de vancomicina atrapada en los liposomas no se cede en las condiciones in vitro del ensayo, lo que concuerda con el comportamiento biofarmacéutico de las vesículas lipídicas, que liberan su contenido al interactuar con tejidos o células determinadas. Teniendo en cuenta que la cantidad no cedida es progresivamente mayor a medida que aumenta la cantidad de albumina se intuye que el número de vesículas atrapadas crece con el aumento de albúmina.

El análisis de las curvas de cantidades remanentes en los vehículos transportadores obtenidos, recogidas en la Fig. 6, demuestra que el proceso cinético de liberación del principio activo es de naturaleza poliexponencial en todos los casos, independientemente de la cantidad de albúmina y principio activo (vancomicina) incorporados en los compuestos.

Los resultados del análisis de las curvas medias muestra un perfil cinético trifásico con valores de exponentes ligeramente superiores para los compuestos de menor contenido en albumina y principio activo, lo que significa velocidades de liberación ligeramente más rápidas, probablemente debido al menor tamaño (mayor superficie específica) de las partículas con menos contenido en proteína y principio activo. La siguiente tabla muestra los resultados del análisis de regresión lineal realizado con las curvas de cantidades remanentes y muestra los valores de coeficientes y exponentes obtenidos para las distintas condiciones experimentales ensayadas.

Carga del liposoma	Albumina Conc	A1	A2	A3	R1	R2	R3	AIC
+	1%	3.53	2.93	5.91	1.18	0.36	0.0049	69.80
+	2%	3.90	4.015	6.90	1.04	0.30	0.0037	48.24
+	3%	2.43	4.95	9.18	1.03	0.32	0.0042	35.49

25 **Ejemplo 6** **Cuantificación de vancomicina y albúmina en las muestras**

En las muestras procedentes del ensayo de diálisis se cuantifica directamente la vancomicina ya que la membrana de diálisis utilizada presenta un cut-off de 12-14 kDa, lo que permite el intercambio de vancomicina (pm= 1500 Da) pero no de albúmina (pm= 77 kDa). Este tipo de muestra sólo contiene agua y vancomicina, lo que permite su cuantificación a partir de la absorbancia medida por espectroscopia UV

a una longitud de onda de 220nm. Se prepararon patrones del principio activo en agua Milli-Q en un rango de concentraciones de 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml y de 0,1 mg/ml a 0,25 mg/mL.

- 5 En las muestras de sobrenadante obtenidas por centrifugación de los floculados hay vancomicina y albumina, esta última interfiere en el ensayo de cuantificación de vancomicina anteriormente descrito. Con objeto eliminar la albúmina de la muestra se procedió a la ultra-centrifugación de los sobrenadantes con tubos de membrana ((Centrisart-1, 10.000Da) que proporcionan un ultrafiltrado libre de albúmina o
- 10 cualquier otro soluto de $M_w > 12-14$ kDa. Se cuantificó la vancomicina en los ultrafiltrados obtenidos en las mismas condiciones anteriormente descritas.

- Para la cuantificación de albúmina en los sobrenadantes se utilizó también una técnica de espectroscopia UV $\lambda_{\text{emission}} = 200\text{nm}$. Los patrones de albúmina se prepararon en
- 15 agua Milli-Q en un rango de concentraciones de 0,05 – 0,20 mg/ml. En este caso la presencia de vancomicina no afecta a la absorbancia de la proteína, por lo que no se requiere un tratamiento previo de la muestra.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Partícula esférica formada por un núcleo recubierto de albúmina mediante interacción electrostática, donde dicho núcleo comprende al menos un liposoma, aniónico o catiónico, de potencial zeta comprendido entre +90mV y - 90mV.
- 2.- Partícula según la reivindicación 1, donde la partícula tiene tamaño micrométrico con un diámetro de partícula comprendido entre 0,1 μ m y 100 μ m.
- 10 3.- Partícula según la reivindicación 2, donde la partícula tiene tamaño micrométrico con un diámetro de partícula comprendido entre 0,2 μ m y 1 μ m.
- 4.- Partícula según la reivindicación 1, donde la partícula tiene tamaño nanométrico con un diámetro de partícula comprendido entre 0,1nm y 100nm.
- 15 5.- Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el liposoma comprende fosfatidilcolina o colesterol, y un lípido con carga iónica, o cualquiera de sus mezclas.
- 20 6.- Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el lípido con carga iónica se selecciona entre dimetildioctadecilamonio, ácido linoleico o fostatidilglicerol.
- 7.- Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la albúmina es albúmina no modificada de origen humano o bovino, fresca o liofilizada.
- 25 8.- Partícula según la reivindicación 7, donde la albúmina es albúmina no modificada de origen humano.
- 30 9. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende un principio activo.
10. Partícula según la reivindicación 9, donde principio activo está encapsulado en el liposoma, atrapado en la cubierta de albúmina o encapsulado en el liposoma y atrapado en la cubierta de albúmina.
- 35

11. Partícula según la reivindicación 10, donde el principio activo se selecciona de la lista que comprende antifúngicos, antibióticos, progestágenos, antineoplásicos, antiretrovirales, analgésicos o antiinflamatorios, agentes de diagnóstico o material paramagnético.

5

12. Partícula según la reivindicación 10, donde el principio activo se selecciona de la lista que comprende vancomicina, ciprofloxacino, anfotericina B, Fluorocitosina, itraconazol, posaconazol, caspofungina, anidulafungina, micafungina, isavuconazol, aminocandina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, penicilinas, cefalosporinas, rifampicina, isoniazida, estreptomina, quinolonas, etinilestradiol, norelgestromina, levonorgestrel, drospirenona, norgestimato, doxorubicina, epirrubina, dactinomina, paclitaxel, docetaxel, lapatinib, capecitabina, tegafur, metotrexato, Efavirenz, atazanavir, sofosbuvir, daclastavir, ledipasvir, ombitasvir, AINES, eletriptan, almotriptan, celecoxib, piroxicam, o fenilbutazona.

10

15

13.- Partícula según la reivindicación 12 donde el principio activo es vancomicina.

14.- Partícula según la reivindicación 12 donde el principio activo es ciprofloxacino.

20

15.- Composición que comprende una partícula según las reivindicaciones 1 a 14, donde dicha composición es preferiblemente farmacéutica o cosmética.

25

16.- Uso de la partícula según las reivindicaciones 1 a 14 como vehículo transportador, preferiblemente para la liberación controlada de principios activos no hidrosolubles.

17.- Uso de la partícula de acuerdo con la reivindicación 16 como vehículo transportador de vancomicina.

30

18.- Uso de la partícula de acuerdo con la reivindicación 16 como vehículo transportador de ciprofloxacino.

19.- Uso de la partícula según las reivindicaciones 9 a 14 para la elaboración de un medicamento.

35

- 20.- Uso de la partícula según las reivindicaciones 9 a 14 para la elaboración de productos teranósticos o vacunas.
- 5 21.- Uso de la partícula según las reivindicaciones 9 a 14 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer, VIH o Hepatitis C.
- 22.- Uso de la partícula según la reivindicación 21 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento en terapias combinadas.
- 10 23.- Un procedimiento de obtención de la partícula según las reivindicaciones 1 a 14 que comprende poner en contacto una suspensión de liposomas con una disolución de albúmina mediante floculación a un pH de entre 4 y 8.
- 15 24.- Un procedimiento de obtención según la reivindicación 23 en la que a la suspensión de liposomas, en agua o solución tamponante, se añade una disolución de albúmina, en agua o solución tamponante, de concentración de entre 0,05 y 30%.
- 20 25.- Un procedimiento de obtención según la reivindicación 24 en la que la solución tamponante comprende sales de fosfato o citrato.
- 26.- Un procedimiento de obtención según la reivindicación 23 en la que la etapa de floculación se induce a pH de entre 3 y 5 cuando se parte de liposomas con potencial zeta negativo.
- 25 27.- Un procedimiento de obtención según la reivindicación 23 en la que la etapa de floculación se induce a pH de entre 5 y 8 cuando se parte de liposomas con potencial zeta positivo.
- 30 28.- Un procedimiento de obtención según las reivindicación 23 a 27 donde la reacción se lleva a cabo a una temperatura de entre 2 y 10°C.
- 29.- Un procedimiento de obtención según las reivindicación 28 donde la temperatura de floculación es de 4°C.
- 35 30.- Un procedimiento de obtención del compuesto según las reivindicación 23 a 29 donde además se añade un principio activo a la suspensión de liposomas.



- ②① N.º solicitud: 201530974
②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.07.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WEECHARANGSAN, WANLOP et al. Efficient Delivery of Antisense Oligodeoxyribonucleotide G3139 by Human Serum Albumin-Coated Liposomes. Molecular Pharmaceutics, 20091207 American Chemical Society 07/12/2009 VOL: 6 No: 6 Pags: 1848 - 1855 ISSN 1543-8384 Doi: doi:10.1021/mp900150g	1-12, 14-16, 18-30
X	JUNG S H et al. Increased stability in plasma and enhanced cellular uptake of thermally denatured albumin-coated liposomes. COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, 20100401 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/04/2010 VOL: 76 No: 2 Pags: 434 - 440 ISSN 0927-7765 Doi: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.12.002 Danino Dganit; Stradner Anna	1-12, 14-16, 18-30
X	WEECHARANGSAN, WANLOP et al. Growth inhibition and chemosensitization of human carcinoma cells by human serum albumin-coated liposomal antisense oligodeoxyribonucleotide against bcl-2.. Drug delivery England Aug 2012 00/08/2012 VOL: 19 No: 6 Pags: 292 - 297 ISSN 1521-0464 (Electronic) Doi: doi:10.3109/10717544.2012.714810 pubmed:22931245	1, 5-12, 14-16, 18-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.10.2016

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/127 (2006.01)

A61K47/42 (2006.01)

A61K38/14 (2006.01)

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

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.10.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3, 13-15, 17, 18, 20, 22, 26, 28, 29	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 4-12, 16, 19, 21, 23-25, 27, 30	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 13, 17	SI
	Reivindicaciones 1-12, 14-16, 18-30	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WEECHARANGSAN, WANLOP et al. Efficient Delivery of Antisense Oligodeoxyribonucleotide G3139 by Human Serum Albumin-Coated Liposomes. <i>Molecular Pharmaceutics</i> , 2009 1207 American Chemical Society 07/12/2009 VOL: 6 No: 6 Pags: 1848 - 1855 ISSN 1543-8384 Doi: doi:10.1021/mp900150g	07.12.2009
D02	JUNG S H et al. Increased stability in plasma and enhanced cellular uptake of thermally denatured Albumin-coated liposomes. <i>COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES</i> , 2010 0401 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/04/2010 VOL: 76 No: 2 Pags: 434 - 440 ISSN 0927-7765 Doi: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.12.002 Danino Dganit; Stradner Anna	01.04.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a una partícula esférica formada por un núcleo recubierto de albúmina mediante interacción electrostática, donde dicho núcleo comprende al menos un liposoma, aniónico o catiónico, de potencial zeta comprendido entre +90mV y -90mV. Se refiere también a su procedimiento de preparación.

El documento D01 divulga un estudio sobre liposomas recubiertos con albúmina sérica humana (HSA) como vehículo para la liberación del oligodesoxirribonucleótido antisentido G3139 (ODN). Para ello, se preparan liposomas catiónicos a partir de bromuro de dimetildioctadecilamonio y fosfatidilcolina, que se mezclan con un volumen igual de ODN en una solución tampón HEPES. Los liposomas-ODN son recubiertos con distintas proporciones de HSA. Las partículas obtenidas son de tamaño nanométrico (28,06 +/- 4,06nm para los liposomas, y 91,1 +/- 11,6nm para los complejos liposoma-ODN).

El documento D02 divulga un estudio sobre el incremento de la estabilidad en plasma y la mejora en la captación celular de liposomas recubiertos con albúmina desnaturalizada, en concreto liposomas que incluyen doxorubicina como principio activo. Los liposomas catiónicos recubiertos con albúmina sérica bovina (BSA) se preparan mediante interacción electrostática entre liposomas catiónicos y moléculas de BSA cargadas aniómicamente, a un pH superior al punto isoeléctrico de la albúmina. Presentan un tamaño medio de partícula de 109+-1nm. Los lípidos empleados para la preparación de los liposomas son fosfatidilcolina, colesterol y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-trimetilamonio-propano (DSTAP).

A la vista de los documentos citados, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1, 2, 4-12, 16, 19, 21, 23-25, 27, 30 de la solicitud no es nueva según el Artículo 6.1 de la Ley de Patentes.

Las reivindicaciones dependientes 3, 14, 15, 18, 20, 22, 26, 28, 29 no contienen ninguna característica adicional que, en combinación con las características de cualquier reivindicación de la que dependan, cumplan las exigencias respecto a la actividad inventiva recogidas en el Artículo 8.1 de la Ley de Patentes.