

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 312**

51 Int. Cl.:

C08F 26/06 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2011** **PCT/ES2011/070188**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011** **WO11113989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2011** **E 11755738 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2548900**

54 Título: **Nanogeles catiónicos para usos biotecnológicos**

30 Prioridad:

18.03.2010 ES 201030399

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2017

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO (33.3%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES;
EINDHOVEN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
(33.3%) y
UNIVERSIDAD DE GRANADA (33.3%)

72 Inventor/es:

FORCADA GARCÍA, JACQUELINE;
IMAZ MAKAZAGA, AINARA;
SAN MARTÍN SÁEZ, ANDONI;
RAMOS JULIÁN, JOSÉ;
VAN HERK, ALEX M. y
HEUTS, JOHANNES A. P.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 645 312 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

Nanogeles catiónicos para usos biotecnológicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a unos nanogeles catiónicos biocompatibles y termosensibles, así como a un método para su producción y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos nanogeles. Entre otras aplicaciones, los nanogeles de la invención se pueden utilizar como vehículos para llevar y liberar agentes biológicamente activos.

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

La familia de polímeros más habitualmente empleada en la síntesis de microgeles y nanogeles sensibles a las condiciones del medio es la de las poli(alquilacrilamidas) sensibles a la temperatura, más concretamente la poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM). Sin embargo, la toxicidad de las poli(alquilacrilamidas) impide su empleo en aplicaciones biomédicas. A pesar de esto, son muchos los artículos y documentos de patente publicados durante estos últimos años sobre este tipo de sistemas. En particular, se han descrito nanogeles que presentan un carácter catiónico. Es este sentido, Moselhy, J. y col. (*Int. J. Nanomedicine* 2009, 4, 153-164) describen nanogeles catiónicos termosensibles basados en una red polimérica de *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) o en un copolímero de la misma con metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo (DMAEMA) y su uso potencial como vehículos de liberación de ADN; Eke, I. y col. (*Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2006, 279, 247-253) describen microgeles catiónicos sensibles tanto al pH como a la temperatura sintetizados a partir de *N*-isopropilacrilamida y *N*-3-dimetilaminopropilmetacrilamida (DMAPM) y su uso en el desarrollo de nuevas superficies relacionadas con aplicaciones biotecnológicas; el documento WO 2006/102762 propone una técnica para injertar grupos ácido borónico en microgeles de PNIPAM con grupos carboxilo, que se utilizan para la liberación controlada de insulina; Nolan, C.M. y col. (*Biomacromolecules* 2006, 7(11), 2918-2922) también investigan la liberación de insulina a partir de microgeles de PNIPAM empleando RMN ¹H de temperatura variable; Sahiner, N. y col. (*Colloid Polym. Sci.* 2006, 284, 1121-1129) hacen referencia a la obtención de micro y nanogeles catiónicos sensibles al pH por medio de polimerización

de cloruro de (3-acrilamidopropil)-trimetilamonio (APTMAC) y a sus numerosas aplicaciones dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, en particular, a su utilidad como vehículos para la liberación controlada de moléculas activas.

- 5 Los monómeros biocompatibles sensibles a la temperatura incluyen *N*-vinilcaprolactama (VCL) [Vihola, H. y col. *Biomaterials* 2005, 26, 3055-3064], que es un monómero soluble en agua. Su polímero correspondiente, poli *N*-vinilcaprolactama (PVCL), combina propiedades muy útiles e importantes ya que, además de ser biocompatible, tiene una transición de fase en la región de la temperatura fisiológica (32-38 °C). Esta combinación de propiedades permite considerarla como un material adecuado para el diseño de dispositivos biomédicos y para su uso en
- 10 sistemas de liberación de fármacos. Por tanto, el documento WO 2008/145612, por ejemplo, describe la obtención de microgeles aniónicos de *N*-vinilcaprolactama adecuados como sistema de liberación de principios activos que experimentan un cambio de fase volumétrica progresivo desde el estado hinchado al colapsado a medida que aumenta la temperatura del medio en el que están dispersos.
- 15 Sin embargo, ninguno de los nanogeles descritos en el estado de la técnica, tanto catiónicos como aniónicos, manifiesta una respuesta inmediata al cambio de temperatura en la región de transición de fase, y menos aún que dicha respuesta suponga un cambio volumétrico de manera que el nanogel pase del estado colapsado al hinchado a medida que aumenta la temperatura.

20 Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han observado que un nanogel catiónico constituido por una red polimérica reticulada de unidades monoméricas de *N*-vinilcaprolactama, obtenido por polimerización en un medio disperso en presencia de un emulsionante catiónico o no-iónico y un iniciador catiónico, sufre un cambio volumétrico instantáneo

25 a la temperatura de transición de fase del polímero (32-38 °C), cambiando del estado colapsado al estado hinchado a medida que aumenta la temperatura, lo que le permite liberar de forma inmediata un principio activo dentro de la región de la temperatura fisiológica.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un nanogel catiónico biocompatible que comprende una red

30 polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de reticulación, en el que dicha red polimérica puede obtenerse por polimerización en un medio disperso de *N*-vinilcaprolactama y un agente de reticulación, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsionante catiónico o no-iónico.

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

El último aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de un nanogel catiónico biocompatible como se ha definido anteriormente, que comprende la polimerización de una composición que comprende *N*-vinilcaprolactama y un agente de reticulación en un medio disperso, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsionante catiónico o no-iónico.

40

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 muestra las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión tomadas a aproximadamente 22 °C y 60 °C que muestran claramente que los nanogeles de la invención están colapsados a temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase del polímero e hinchados a temperaturas por encima de dicha temperatura.

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

La Figura 3 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio con respecto a la

55 temperatura experimentada por los nanogeles constituidos por un copolímero de *N*-vinilcaprolactama (VCL) y metacrilato de metilo (MMA) [a) 90 % de VCL/10 % de MMA; b) 80 % de VCL/20 % de MMA; c) 70 % de VCL/30 % de MMA; d) 50 % de VCL/50 % de MMA].

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

60

La Figura 5 es una gráfica que muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio con respecto a la temperatura experimentada por los nanogeles de la invención para distintas concentraciones de iniciador: a) 1 % en peso de iniciador ADIBA (E2011); b) 0,5 % en peso de iniciador ADIBA (E2010.5); c) 0,3 % en peso de iniciador ADIBA (E2010.3).

65

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

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

Descripción detallada de la invención

- 10 En un aspecto, la invención se refiere a un nanogel catiónico biocompatible, en lo sucesivo en el presente documento nanogel de la invención, que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de reticulación, en el que dicha red polimérica puede obtenerse por polimerización de *N*-vinilcaprolactama y un agente de reticulación en un medio disperso, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsionante catiónico o no-iónico.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término "nanogel", se refiere a una partícula de hidrogel tridimensional cuyo diámetro medio es inferior a 1 µm, es decir, un diámetro comprendido entre 1 y 999 nm. Análogamente, un "hidrogel" es una red macromolecular tridimensional que se hincha en agua y se forma a partir de un polímero reticulado (por ejemplo, unidades poliméricas interconectadas entre sí por medio de un agente de reticulación).

- 20 La naturaleza catiónica del nanogel de la invención es resultado de la utilización de un iniciador catiónico en el proceso de polimerización.

- 25 Dicho nanogel de la invención, si se desea, puede contener adicionalmente, al menos, un agente biológicamente activo, que da origen a un nanogel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo que puede utilizarse para llevar, entregar y/o dosificar agentes biológicamente activos al sitio de interés. Los nanogeles biocompatibles, cargados o no con agentes biológicamente activos, proporcionados por la presente invención son sensibles a los cambios de temperatura del medio en el que están dispersos, y pueden hincharse y encogerse (es decir, cambiar de tamaño), respondiendo de este modo a estímulos de temperatura.

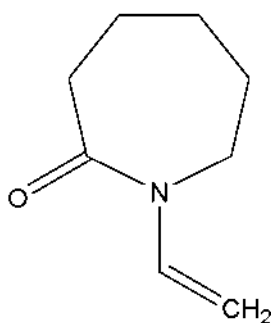
- 30 En particular, la principal ventaja de los nanogeles catiónicos biocompatibles termosensibles de la presente invención con respecto a otros nanogeles del estado de la técnica es que, además de ser biocompatibles, experimentan un cambio volumétrico instantáneo a la temperatura de transición de fase del polímero, cambiando del estado colapsado al estado hinchado a medida que aumenta la temperatura, permitiendo de este modo la liberación inmediata del principio activo dentro de la región de la temperatura fisiológica.

- 35 La figura 1 muestra las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión para un nanogel catiónico de acuerdo con la presente invención, tomadas a aproximadamente 22 °C y 60 °C, en las que se puede observar cómo las partículas del nanogel están hinchadas a temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase del polímero principal que constituye la red polimérica y colapsadas por debajo de dicha temperatura. Muestra además que el nanogel no aumenta de tamaño como resultado de la aglomeración o agregación de varias partículas sino como resultado del hinchamiento de las partículas de nanogel individuales.

- 45 Las nanopartículas de nanogel biocompatible cargado o no con un agente biológicamente activo proporcionadas por la presente invención pueden liofilizarse y después resuspenderse en un medio acuoso conservando inalteradas sus propiedades y termosensibilidad. Por tanto, los nanogeles proporcionados por la presente invención son materiales biocompatibles, útiles como vehículos de agentes biológicamente activos, capaces de absorber (encapsular/captar) agentes biológicamente activos tanto hidrófobos como hidrófilos, y de dosificarse apropiadamente puesto que responden a estímulos de temperatura del medio en el que están dispersos.

- 50 *N*-vinilcaprolactama (VCL)

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



La VCL es un monómero anfílico puesto que contiene grupos hidrófilos (amida) y grupos hidrófobos (grupo vinilo y grupos alquilo del anillo de la lactama). La VCL es parcialmente soluble en agua, siendo su solubilidad del 8,5 % en peso. La solubilidad en agua del correspondiente homopolímero, poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL), varía con la temperatura. La presencia de los grupos hidrófobos e hidrófilos significa que coexisten fuerzas repulsivas y

atractivas. El equilibrio de estas fuerzas determina la solubilidad del polímero.

Algunos polímeros son solubles en agua a baja temperatura, separándose de la solución y formando una fase separada a medida que aumenta la temperatura por encima de un valor conocido como "temperatura de solución crítica inferior" (LCST, del inglés *lower critical solution temperature*), también denominada "temperatura crítica de cambio de fase". En el caso de la PVCL, esta temperatura crítica de cambio de fase está en el intervalo comprendido entre 32 y 38 °C, es decir, cercano a la temperatura fisiológica.

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

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

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

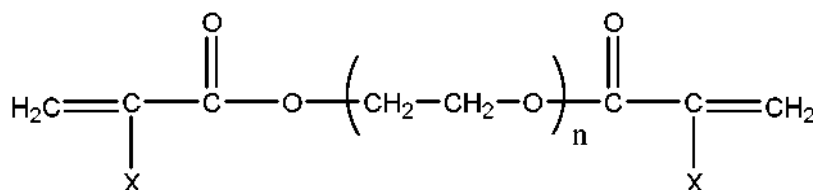
Agente de reticulación

De acuerdo con la presente invención, el componente "agente de reticulación" es un monómero difuncional que comprende al menos dos grupos vinilo.

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

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

En otra realización particular, dicho agente de reticulación es un monómero difuncional que, además de dos grupos vinilo, comprende al menos una unidad de etilenglicol. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de dicho agente de reticulación incluyen un monómero difuncional de fórmula general



en la que

X es hidrógeno o metilo, y

n es un número entero comprendido entre 1 y 90.

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

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

- 5 En una realización particular, el agente de reticulación es un monómero difuncional seleccionado entre el grupo que consiste en un dextrano con dos o más grupos vinilo, *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA), EGDA, PEGDA, EGDMA, PEGDMA y mezclas de los mismos.

- 10 Algunos de dichos agentes de reticulación tienen la característica de que, además de los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo, los átomos de oxígeno presentes en las unidades de etilenglicol pueden formar enlaces de hidrógeno con grupos carboxilo.

- 15 La concentración de agente de reticulación con respecto a la VCL presente en la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para la obtención de las unidades de polímero interconectadas entre sí a través de dicho agente de reticulación que constituyen la red polimérica del nanogel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo del diámetro deseado del nanogel biocompatible de la invención (a temperaturas más altas o bajas que la LCST); sin embargo, en una realización particular, la concentración de agente de reticulación presente en dicha receta está comprendida entre el 2 % y el 10 % en peso con respecto a la VCL; en una realización aún más particular, la concentración de agente de reticulación presente en dicha receta es de aproximadamente el 8 % en peso con respecto a la VCL.

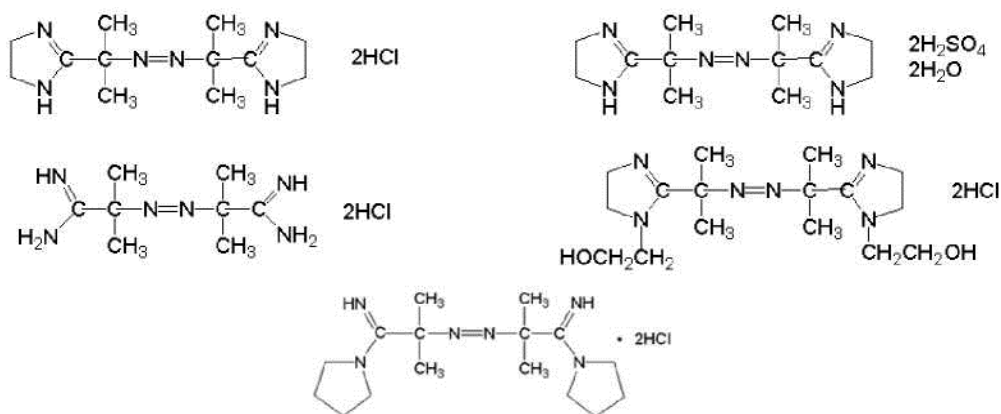
Iniciador catiónico

- 25 De acuerdo con la presente invención, el componente "iniciador catiónico" se refiere a un compuesto que se descompone por medio de activación térmica generando especies reactivas cargadas positivamente que inician el proceso de polimerización radicalaria. Como resultado, el iniciador empleado en la invención es un iniciador térmico catiónico.

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

- 35 Aunque podría usarse prácticamente cualquier iniciador apropiado capaz de descomponerse y generar especies positivas, en una realización particular, dicho iniciador se selecciona entre el grupo que consiste en diclorhidrato de 2,2'-azobis (N,N'-dimetileno isobutiramidina) (ADIBA), dihidrato de disulfato de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano], diclorhidrato de 2,2'-azobisisobutiramidina (AIBA), diclorhidrato de 2,2'-azobis{2-[1-(2-hidroxietil)-2-imidazolin-2-il]propano} y diclorhidrato de 2,2'-azobis(1-imino-1-pirrolidino-2-etilpropano).

- 40 Las fórmulas respectivas de estos iniciadores se muestran a continuación:



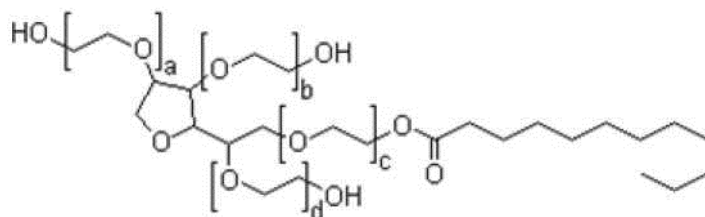
- 45 De acuerdo con una realización preferida, el iniciador empleado es el diclorhidrato de 2,2'-azobis(N,N'-dimetileno isobutiramidina) (ADIBA), que se descompone térmicamente proporcionando especies reactivas catiónicas que permiten iniciar la polimerización y la reticulación de la VCL por vía radicalaria.

- 50 La concentración de iniciador que puede utilizarse para poner en práctica dicho método puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la concentración de iniciador está comprendida entre el 0,3 % y el 1,5 % en peso con respecto a VCL; en realizaciones aún más particulares, la concentración de iniciador presente en dicha receta oscila entre el 0,3 y el 1,2 % en peso con respecto a VCL.

Emulsionante

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

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

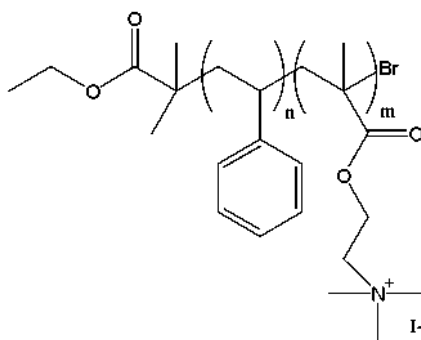


en la que $a + b + c + d = 20$

En otra realización particular, dicho emulsionante es un emulsionante catiónico. Más en particular, dicho emulsionante catiónico es un haluro de alquiltrimetilamonio. El haluro de alquiltrimetilamonio se selecciona preferentemente entre bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) y bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), que tienen, respectivamente, las siguientes fórmulas:



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



en la que n y m son números enteros comprendidos entre 5 y 50.

Entre los compuestos que corresponden a esta fórmula, se prefiere el empleo del copolímero de bloque de estireno y metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo definido en la fórmula anterior en el que $n = 7$ y $m = 13$. En toda la presente memoria descriptiva dicho compuesto se denomina S7A13.

Estos copolímeros de bloque se pueden sintetizar por cualquier método conocido por un experto en la materia. Sin embargo, en una realización particular, la síntesis de dicho copolímero se realiza en tres etapas. Una primera etapa de polimerización de la cadena de poliestireno que se realiza en presencia de un iniciador y que es catalizada por un complejo de cobre, tal como por ejemplo $\text{CuBr}_2/\text{tris}[2\text{-(dimetilamino)etil}]\text{amina}$; una segunda etapa de elongación de la cadena de poliestireno con metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo (también denominado DMAEMA) que se realiza por reacción del poliestireno con DMAEMA en presencia del complejo de cobre mencionado; y una tercera etapa de cuaternización del grupo amino del metacrilato por reacción con un haluro de alquilo, tal como por ejemplo yoduro de metilo. Un ejemplo detallado de la síntesis de este copolímero de bloque se detalla en el ejemplo 1, en el que $n = 7$ y $m = 13$.

La concentración de emulsionante que se puede utilizar para poner en práctica el procedimiento de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la concentración de emulsionante está comprendida entre el 0,2 % y el 25 % en peso con respecto a VCL; en una realización aún más particular, la concentración de emulsionante presente en dicha receta puede oscilar entre el 0,3 y el 20 % en peso con respecto a VCL.

Obtención del nanogel catiónico objeto de la invención

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

La reacción de polimerización puede realizarse a una temperatura comprendida dentro de un amplio intervalo; sin embargo, cuando se elige la temperatura de reacción es muy importante tener en cuenta la temperatura crítica de cambio de fase (LCST) de las unidades de polímero que constituyen la red polimérica del nanogel biocompatible de la invención. En una realización particular, la reacción de polimerización se realiza a una temperatura superior a las LCST de las distintas unidades de polímero que forman parte de los nanogeles biocompatibles de la invención. En una realización concreta, la reacción de polimerización se realiza a una temperatura igual o superior a 60 °C.

Análogamente, la velocidad de agitación de la formulación (receta) que contiene los componentes necesarios para generar el nanogel biocompatible de la invención por medio de polimerización en un medio disperso como se ha mencionado anteriormente puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, la velocidad de agitación debe ser lo suficientemente alta como para conseguir una mezcla homogénea de la dispersión (mezcla de reacción) cuando se sintetizan los nanogeles biocompatibles de la invención. En una realización particular, la velocidad de agitación es igual o superior a 200 rpm; en otra realización particular, la velocidad de agitación está comprendida entre 200 y 400 rpm, por ejemplo aproximadamente 300 rpm.

La reacción de polimerización puede realizarse en un reactor de forma discontinua (o por lotes) o de forma semicontinua.

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

- Diámetro de partícula colapsada (15 °C): 30-60 nm
- Diámetro de partícula hinchada (55 °C): 150-800 nm
- Temperatura de transición de fase: 32,5 °C - 38 °C

Los nanogeles catiónicos de la invención se pueden dispersar tanto en agua como liofilizados. Una vez liofilizados, si se resuspenden en un medio acuoso, mantienen sus propiedades y capacidad de hinchamiento/colapso con respecto a cambios de temperatura del medio de dispersión.

Nanogeles biocompatibles cargados con un agente biológicamente activo

Como se ha mencionado anteriormente, los nanogeles catiónicos biocompatibles de la invención son capaces de captar o encapsular agentes biológicamente activos. Por tanto, en una realización particular, el nanogel biocompatible de la invención comprende adicionalmente un agente biológicamente activo. En general, dicho agente biológicamente activo puede estar en el interior del nanogel biocompatible de la invención; sin embargo, en ocasiones el agente biológicamente activo también puede estar unido o adsorbido sobre la superficie externa de dicho nanogel.

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

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

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

Por otra parte, a diferencia de los nanogeles aniónicos de PVCL, los nanogeles catiónicos de la invención permiten liberar inmediatamente el ingrediente activo debido al cambio volumétrico instantáneo que experimentan.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente biológicamente activo" se refiere a cualquier sustancia que se administra a un sujeto, preferentemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia que se puede utilizar en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales, por ejemplo, fármacos, antígenos, alérgenos, etc.

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

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

Los nanogeles biocompatibles de la invención (y, en consecuencia, las nanopartículas de nanogeles biocompatibles de la invención) pueden utilizarse como vehículos para la administración tanto de sustancias hidrófilas como de sustancias hidrófobas. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de agentes biológicamente activos (definidos por grupos terapéuticos) encapsulados en el interior de dichos nanogeles y nanopartículas que pueden utilizarse incluyen: sustancias anticancerígenas, antibióticos, inmunodepresores, sustancias antivíricas, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares y sustancias contra el Parkinson, antiespasmódicos y agentes de contracción muscular, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoarios, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, anestésicos locales, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos, neurotransmisores, proteínas, modificadores de la respuesta celular y vacunas.

Por tanto, los nanogeles proporcionados por la presente invención son materiales biocompatibles, útiles como vehículos de agentes biológicamente activos, capaces de absorber (encapsular/captar) agentes biológicamente activos tanto hidrófobos como hidrófilos, y se dosifican apropiadamente puesto que responden a estímulos de temperatura del medio en el que se dispersan.

Los nanogeles biocompatibles de la invención pueden captar o encapsular el agente biológicamente activo por métodos convencionales. En una realización particular, la reacción de polimerización en un medio disperso para producir el nanogel biocompatible de la invención puede realizarse en presencia del agente biológicamente activo con el fin de encapsular dicho agente en su interior. Como alternativa, el método de obtención del nanogel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo proporcionado por la presente invención comprende poner en contacto una dispersión que comprende un nanogel biocompatible de la invención con una disolución que comprende dicho agente o agentes biológicamente activos que se han de encapsular.

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

activo que ha quedado en el sobrenadante.

Composiciones farmacéuticas

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

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

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

30 La proporción del agente biológicamente activo incorporada en los nanogeles biocompatibles de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 50 % en peso con respecto al peso total de las nanopartículas. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la moléculas biológicamente activa incorporada.

35 La invención se describe a continuación por medio de varios ejemplos no limitantes ilustrativos de la invención.

Ejemplos

40 Materiales

El monómero principal: *N*-vinilcaprolactama (VCL, Aldrich); el iniciador catiónico: diclorhidrato de 2,2'-azobis (*N,N'*-dimetileno isobutiramidina) (ADIBA, Wako Chemical GmbH); el agente de reticulación: diacrilato de poli(etileno glicol) (PEGDA 200, Polyscience) y los emulsionantes: bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) y Tween 20, se adquirieron en el mercado.

El emulsionante catiónico S7A13 (copolímero de bloque con 7 unidades de estireno y 13 de DMAEMA) se preparó de acuerdo al método que se muestra en el siguiente ejemplo.

50 Ejemplo 1. Síntesis de S7A13: copolímero de bloque anfífilico de poliestireno (PSty) y metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo (PDMAEMA).

Materiales

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

- Estireno (Aldrich), que se purificó mediante destilación (5 mbar (0,5 kPa) a 25 °C);
- Metacrilato de dimetiletilamina (Aldrich), que también se purificó por medio de destilación (2 mbar (0,2 kPa) a 25 °C);
- 60 - Bromuro de cobre (II) (CuBr₂) (Aldrich), que se utilizó tal cual se adquirió (99-100 % de pureza).
- Etil-2-bromoisobutirato (EBiB) (Aldrich), que se purificó por medio de destilación (3 mbar (0,3 kPa) a 30°C); y
- tris[2-(dimetilamino)etil]amina (Me₆TREN), que se preparó como se describe en *Macromolecules*, 1998, 31, 5958 o en *Inorg. Chem*, 1966, 5, 41.

65

Síntesis del macroiniciador PSty

El macroiniciador PSty se preparó utilizando 2-bromoisobutirato de etilo (EBiB) como iniciador. La reacción fue catalizada por el complejo $\text{CuBr}_2/\text{tris}[2\text{-(dimetilamino)etil}]\text{amina}$ (Me_6TREN) en argón. El anisol se utilizó como disolvente y se añadió ácido ascórbico en exceso como agente reductor para reducir el Cu(II) a Cu(I) . Los distintos componentes empleados en la síntesis del macroiniciador PSty así como las cantidades de cada uno de ellos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes para la síntesis del macroiniciador PSty-Br

	g	Equivalentes	mol
Estireno	59	9,57	0,57
EBiB (98 %)	11	1	0,06
CuBr_2	0,13	0,009	0,000567
$\text{tris}[2\text{-(dimetilamino)etil}]\text{amina}$ (Me_6TREN)	1,3	0,076	0,004547
Ácido ascórbico	1	10,2	0,005763
Anisol	43	35	0,40

El ligando (Me_6TREN) y el CuBr_2 se mezclaron en un tubo Schlenk con 5 gramos de anisol para formar el complejo $\text{CuBr}_2/\text{tris}[2\text{-(dimetilamino)etil}]\text{amina}$. Se burbujeó argón a través de la disolución del complejo durante 15 minutos mientras se agitaba. El ácido ascórbico se disolvió en el resto del anisol y se adicionó a un matraz de tres bocas de 250 ml. El estireno y la disolución con el complejo se transfirieron al matraz. Se realizaron 3 ciclos de enfriamiento sobre la mezcla de reacción y se mantuvo en atmósfera de argón durante toda la reacción. La temperatura del baño de aceite se fijó en 90 °C y cuando la temperatura de la mezcla de reacción fue de 90 °C, se añadió el iniciador EBiB con el fin de comenzar la polimerización. La reacción procedió durante 32 horas. Se tomaron alícuotas de 1 ml durante la reacción. Los pesos moleculares se midieron mediante cromatografía de exclusión de tamaño (CET). La conversión se siguió mediante cromatografía de gases utilizando el disolvente de reacción como patrón interno. El producto final se purificó mediante precipitación en metanol. El polímero obtenido se secó al vacío en un horno a 40 °C durante 24 horas. El producto se caracterizó mediante CET y MALDI-TOF y RMN ^1H .

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

Elongación de la cadena del macroiniciador PSty-Br con DMAEMA

La cadena del macroiniciador (PSty-Br) se elongó con DMAEMA con el fin de proporcionar un copolímero de bloque. El macroiniciador (PSty-Br), DMAEMA y 95 % en peso de anisol se añadieron en un matraz de tres bocas. Se aplicaron 3 ciclos de enfriamiento a la mezcla de reacción y se mantuvo en atmósfera de argón durante toda la reacción. La mezcla de reacción se calentó a 25 °C. Por otra parte, se desgasificó una mezcla del complejo $\text{CuBr}_2/\text{tris}[2\text{-(dimetilamino)etil}]\text{amina}$ (Me_6TREN) y 5 % de anisol con argón durante 15 minutos y se añadió a la mezcla de reacción anterior. Los componentes empleados para la reacción de extensión de cadena de PSty-Br con DMAEMA, así como sus correspondientes cantidades se muestran en la Tabla 2. La reacción transcurrió durante 24 horas. El producto final se recristalizó en *N*-heptano para eliminar el PSty-Br que no había reaccionado. Incluso cuando el producto final contenía cantidades muy pequeñas de cobre, el copolímero de bloque se ultra-purificó por medio de la disolución de 50 g del polímero obtenido en 1 l de agua acidificada con 10 ml de HCl_{aq} (33 %). Después, se neutralizó la solución mediante la adición de 20 g de una solución de NaOH en agua al 25 %. Se recuperó el copolímero de bloque precipitado y posteriormente se secó en un horno a vacío a 40 °C durante 24 horas. La composición del copolímero de bloque se determinó por medio de RMN ^1H .

Tabla 2. Componentes para la elongación del macroiniciador PSty-Br con DMAEMA

	g	Equivalentes	mol
DMAEMA	76	8,54	0,43
Psty-Br ($M_n=878$ g/Mol)	43	1	0,050
CuBr_2	0,11	0,010	0,0005
$\text{tris}[2\text{-(dimetilamino)etil}]\text{amina}$ (Me_6TREN)	1,14	0,100	0,005
Ácido ascórbico	0,87	9,9	0,005
Anisol	189	35	1,75

La reacción de elongación de cadena mostró un comportamiento lineal cuando se representó M_n con respecto a la conversión, lo que demuestra que la reacción transcurre con un mecanismo controlado. La conversión final fue del 90 % después de 24 horas. Se recuperó entre un 10 y un 20 % de la cantidad total del macroiniciador PSty inicialmente incorporado después del final de la reacción, mostrando que una fracción significativa del macroiniciador

no puede elongarse. La composición final del copolímero de bloque de acuerdo con el espectro de RMN ^1H fue de 13 unidades de DMAEMA y 7 unidades de estireno. Tras la purificación final, se comprobó por espectroscopía atómica que el contenido total de cobre era prácticamente despreciable.

5 Cuaternización de PSty₇-b-PDMAEMA₁₃

El copolímero de bloque se disolvió en 4,5 veces su peso en THF y se añadió CH_3I en doble exceso molar. La reacción transcurrió durante 24 horas a temperatura ambiente. Se recuperó poliestireno-b-poli(metacrilato de trimetilamonio etilo) (PSty-b-PTMAEMA) de la mezcla tras completar la reacción por medio de la eliminación del THF y lavando posteriormente el polímero con dietiléter. El exceso utilizado de CH_3I garantizó que la cantidad total de los grupos de DMAEMA estuviera totalmente cuaternizada. Se realizaron análisis por RMN ^1H utilizando D_2O como disolvente para demostrar que todos los grupos amino estaban cuaternizados.

15 Ejemplo 2: Síntesis de nanogeles catiónicos estabilizados con S7A13

Estos nanogeles se sintetizaron por lotes (de forma discontinua) en un reactor por medio de copolimerización en emulsión. Se usó VCL como monómero principal, PEGDA como agente de reticulación, S7A13 como emulsionante y ADIBA como iniciador.

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

Tabla 3. Variación de concentración de S7A13

Reactivos	E2.5	E5	E10	E15	E20
PEGDA (% p/p M)	8	8	8	8	8
S7A13 (% p/p M)	2,5	5	10	15	20
ADIBA (% p/p M)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

* Condiciones de reacción: rpm = 300; tiempo de reacción = 5 h; T = 70 °C; * [VCL] = 1 % p/p

25 Tabla 4. Variación de concentración de ADIBA

Reactivos	E20I1.0	E20I0.5	E20I0.3
PEGDA (% p/p)	8	8	8
S7A13 (% p/p)	20	20	20
ADIBA (% p/p)	1,2	0,6	0,36

* Condiciones de reacción: rpm = 300; tiempo de reacción = 5 h; T = 70 °C; * [VCL] = 1 % p/p

Ejemplo 3: Síntesis de nanogeles catiónicos estabilizados con un tipo diferente de emulsionante (S7A13, HDTAB, DTAB, o Tween 20)

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

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

35 Tabla 5

Reactivos	E20	H20	D20	NI20
PEGDA (% p/p M)	8	8	8	8
S7A13 (mol % M)	0,3	-	-	-
HDTAB (mol % M)	-	0,3	-	-
DTAB (mol % M)	-	-	0,3	-
Tween 20 (mol % M)	-	-	-	0,3
ADIBA (% p/p M)	1,2	1,2	1,2	1,2

* Condiciones de reacción: rpm = 300; tiempo de reacción = 5 h; T = 70 °C; * [VCL] = 1 % p/p

Ejemplo 4. Efecto de la temperatura del medio sobre el diámetro hidrodinámico promedio del nanogel

40 La Figura 4 muestra la respuesta de los nanogeles catiónicos, sintetizados con diferentes concentraciones de S7A13, a los cambios de temperatura del medio de dispersión. Como se puede observar, los nanogeles se colapsan

cuando la temperatura del medio se encuentra entre 10-30 °C. Después se produce un cambio o salto instantáneo de tamaño (diámetro hidrodinámico promedio) que coincide con la temperatura de transición de fase del homopolímero de polivinilcaprolactama (PVCL) que se obtendría tras polimerizar en solitario el monómero de vinilo (VCL) utilizado en la síntesis como monómero principal. A bajas temperaturas, los tamaños no varían con la concentración de emulsionante. Sin embargo, cuando la temperatura del medio está por encima de la temperatura de transición se observan diferencias: cuanto mayor es la concentración de emulsionante, mayor es el tamaño del nanogel.

A continuación, la Figura 5 muestra la respuesta de los nanogeles catiónicos, sintetizados variando la concentración de iniciador, a los cambios de temperatura del medio. Se puede apreciar que la disminución de la concentración de iniciador provoca la reducción del tamaño de los nanogeles a altas temperaturas. Además, el comportamiento del nanogel es reversible y el salto se produce tanto tras calentar como tras enfriar el medio en el que el nanogel está disperso.

En términos del efecto del tipo de emulsionante, la Figura 6 muestra que los nanogeles sintetizados con emulsionante tanto catiónico (HDTAB o DTAB) como no iónico (Tween 20) presentan el mismo comportamiento que el nanogel E20 en el que se ha utilizado el copolímero de bloque anfifílico S7A13. Hay que tener en cuenta que aunque en la síntesis del nanogel NI20 no se ha utilizado emulsionante catiónico, también es un nanogel catiónico debido a la carga positiva proveniente del iniciador (ADIBA).

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

En términos del salto en la transición, éste decrece cuando se usa HDTAB o DTAB como emulsionante, obteniéndose tamaños hinchados inferiores a los de los nanogeles E20 y NI20. Por tanto, es evidente la mejora proporcionada por la utilización del copolímero de bloque anfifílico S7A13 en la receta con respecto al salto instantáneo del estado colapsado al estado hinchado experimentado por las partículas de nanogel a medida que aumenta la temperatura por encima del valor de la transición de fase de PVCL.

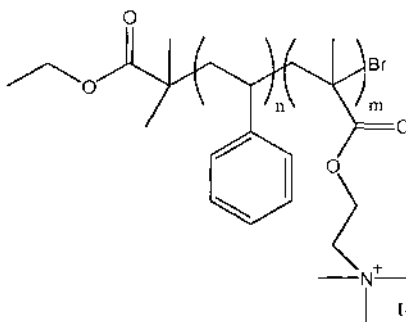
Sigue observándose que el comportamiento del nanogel es reversible ya que el salto instantáneo del estado colapsado al estado hinchado se produce tanto tras calentar como tras enfriar el medio en el que el nanogel está disperso.

Ejemplo 5. Liofilización - redispersión

La figura 7 muestra el comportamiento del nanogel catiónico de referencia (E20) en dispersión (no liofilizado) y después de su liofilización y posterior redispersión (tiempo de resuspensión en minutos). El comportamiento del nanogel liofilizado y después resuspendido en agua es el mismo que el del nanogel no liofilizado, es decir, se colapsa a bajas temperaturas y se hincha a altas temperaturas. Se observa que el salto instantáneo se produce a la misma temperatura y que los tamaños colapsados a bajas temperaturas (10-30 °C) se mantienen idénticos, mientras que los tamaños correspondientes al estado hinchado a altas temperaturas se ven afectados por la liofilización, siendo más pequeños que los del nanogel que no se ha liofilizado.

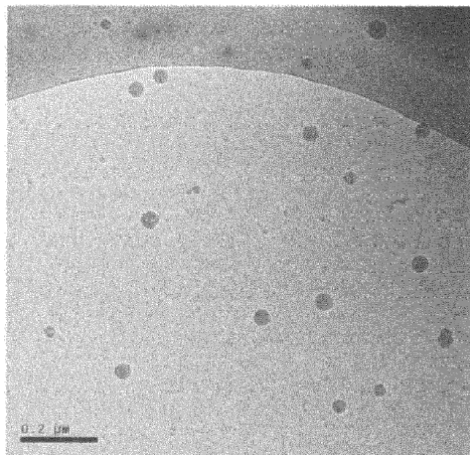
REIVINDICACIONES

1. Un nanogel catiónico biocompatible que comprende una red de polímero, consistiendo dicha red de polímero en unidades de polímero interconectadas entre sí a través de un agente de reticulación, en el que dicha red de polímero puede obtenerse por polimerización de *N*-vinilcaprolactama y un agente de reticulación en un medio disperso, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsionante catiónico o no iónico.
2. El nanogel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente de reticulación es un monómero difuncional que comprende al menos dos grupos vinilo.
3. El nanogel de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el agente de reticulación se selecciona entre dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), dimetacrilato de polidietilenglicol (PEGDMA), diacrilato de etilenglicol (EGDA), diacrilato de polidietilenglicol (PEGDA), etilenglicol di(1-metacrililoxi)etil éter, *N,N'*-metilenbisacrilamida (BA), un dextrano con más de un grupo vinilo, y mezclas de los mismos.
4. El nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el iniciador catiónico se selecciona entre el grupo que consiste en diclorhidrato de 2,2'-azobis(*N,N'*-dimetileno isobutiramidina) (ADIBA), dihidrato de disulfato de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano], diclorhidrato de 2,2'-azobisisobutiramidina (AIBA), diclorhidrato de 2,2'-azobis{2-[1-(2-hidroxietil)-2-imidazolin-2-il]propano} y diclorhidrato de 2,2'-azobis(1-imino-1-pirrolidino-2-etilpropano).
5. El nanogel de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el iniciador catiónico es diclorhidrato de 2,2'-azobis(*N,N'*-dimetileno isobutiramidina) (ADIBA).
6. El nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el emulsionante es un emulsionante catiónico.
7. El nanogel de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el emulsionante catiónico se selecciona entre bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio y un copolímero de bloque de amonio cuaternario.
8. El nanogel de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el copolímero de bloque de amonio cuaternario es un copolímero de bloque de estireno y metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo de fórmula:



9. El nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente un agente biológicamente activo.
10. El nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en forma de nanopartículas.
11. El nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en una forma liofilizada.
12. Una composición farmacéutica que comprende un nanogel catiónico biocompatible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
13. Un método para la obtención de un nanogel catiónico biocompatible de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la polimerización de una composición que consiste en *N*-vinilcaprolactama y un agente de reticulación en un medio disperso, en presencia de un iniciador catiónico y un emulsionante catiónico o no iónico.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha polimerización se realiza en presencia de un agente biológicamente activo.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende adicionalmente poner en contacto dicho nanogel biocompatible con una solución que comprende un agente biológicamente activo.



T=22 °C

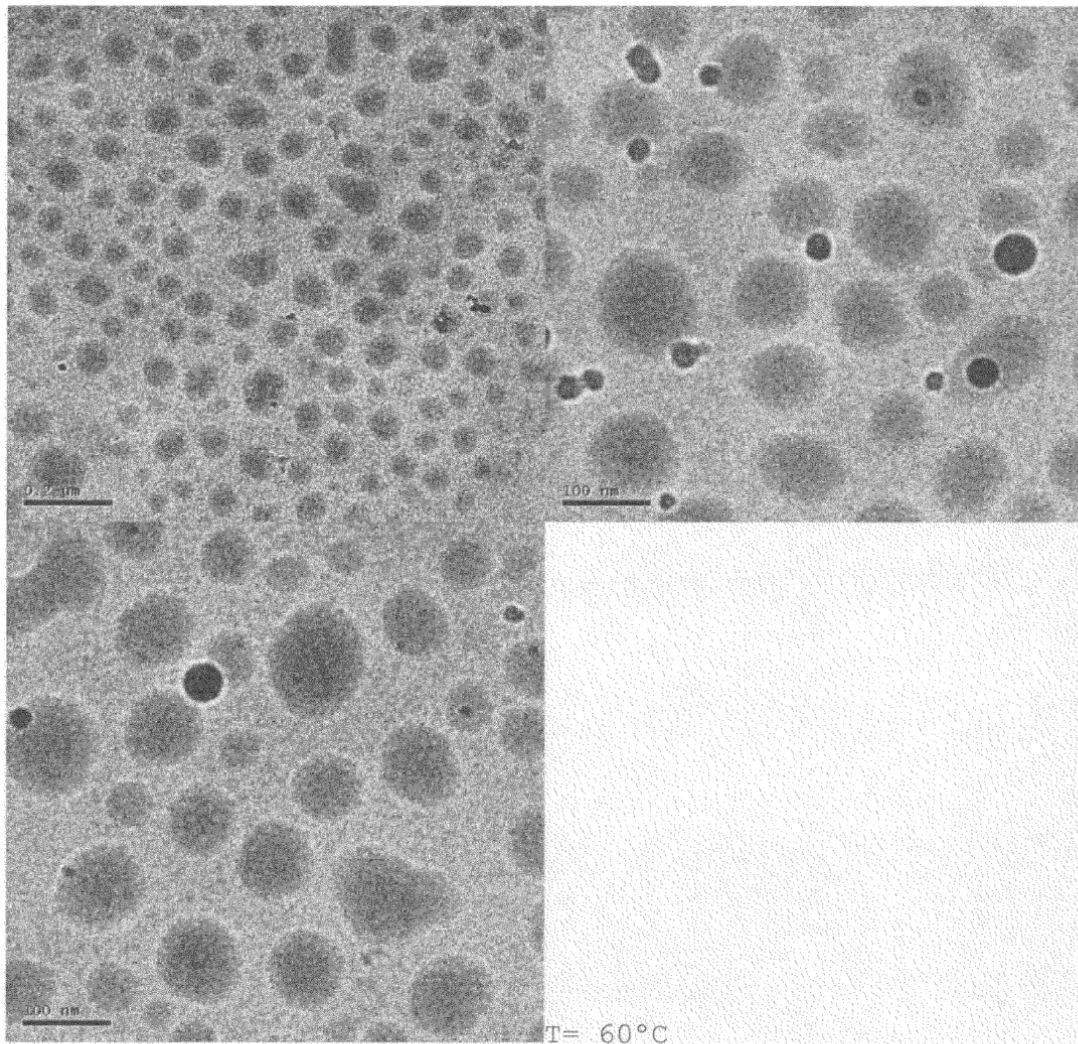


Figura 1

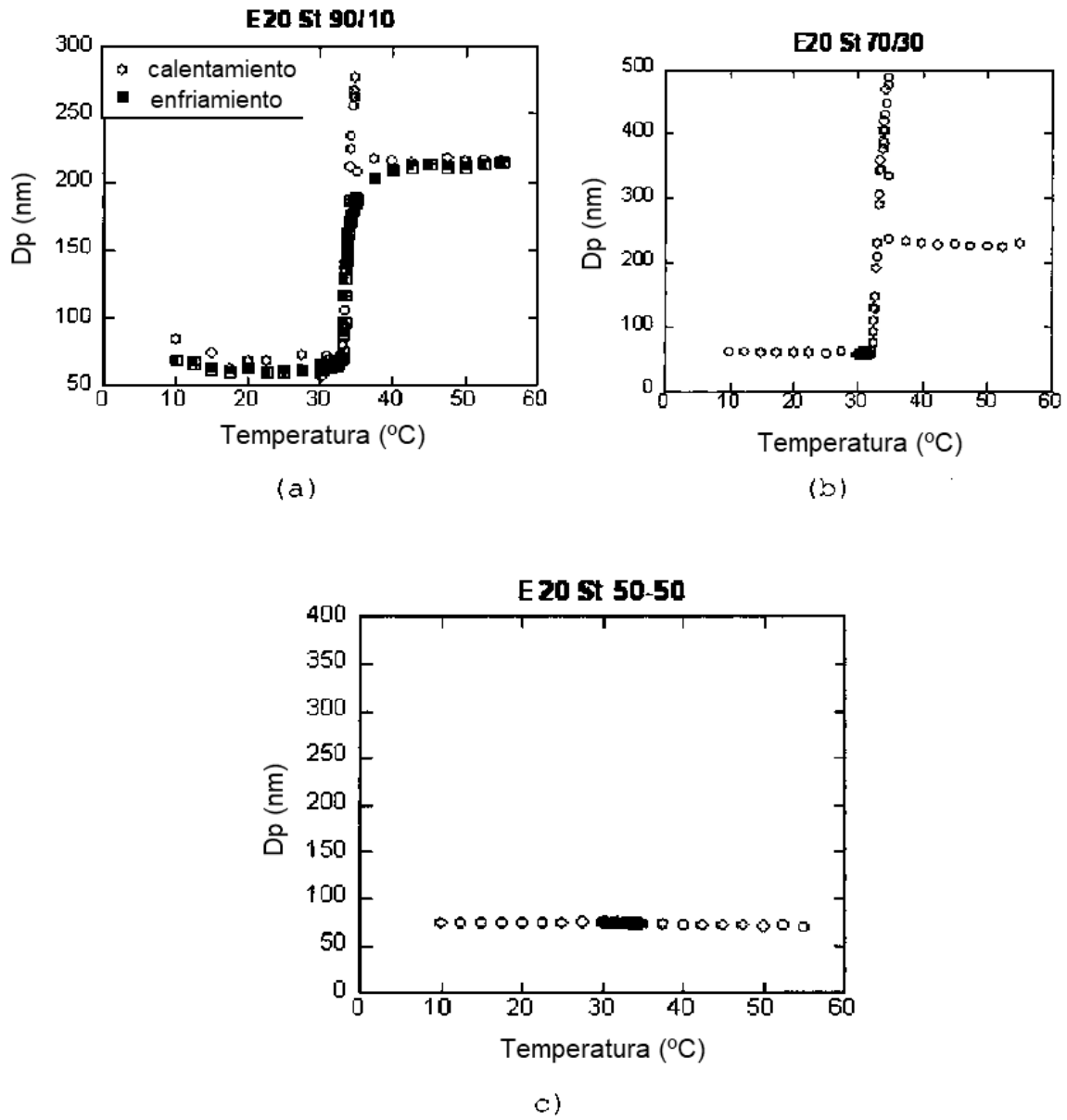


Figura 2

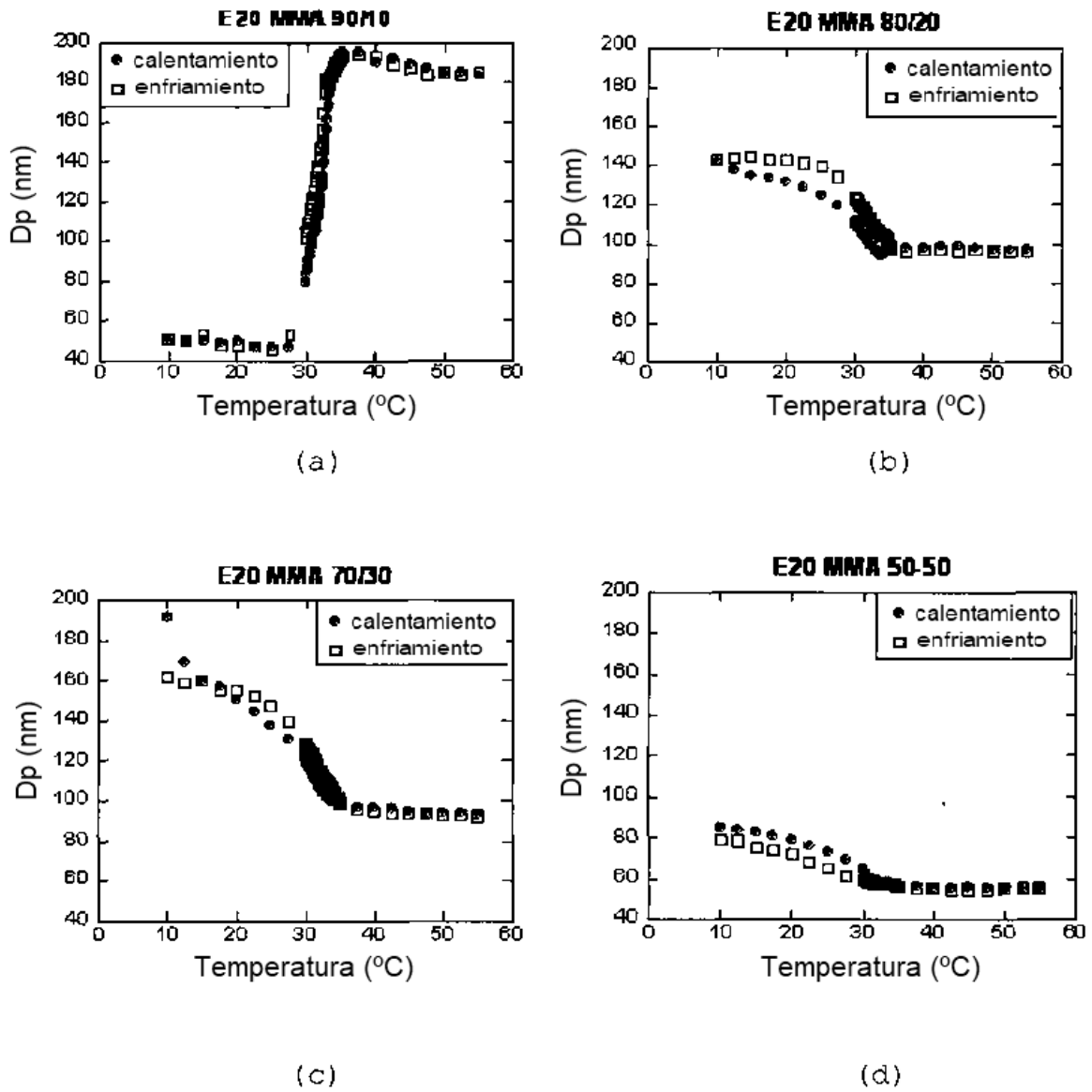


Figura 3

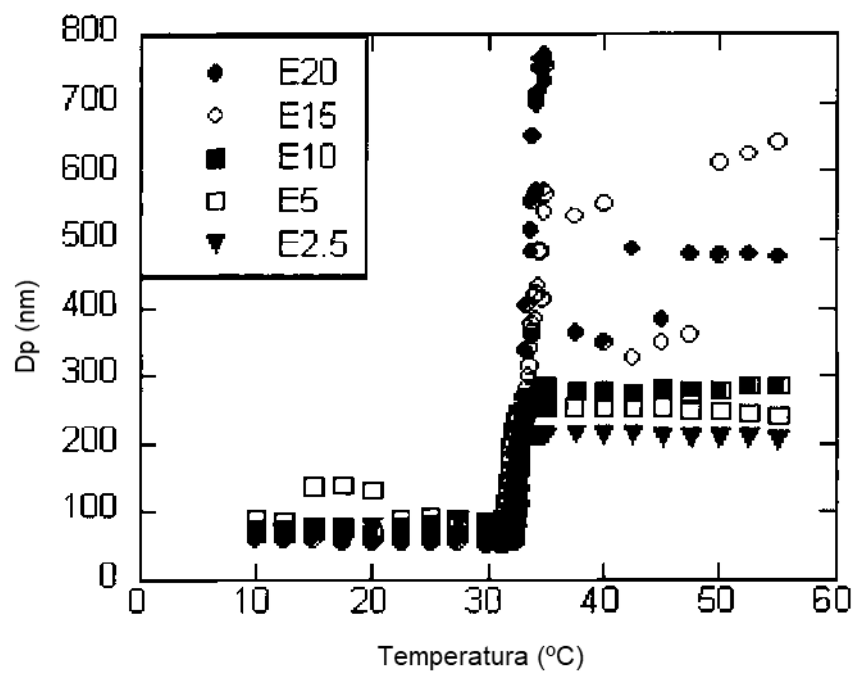


Figura 4

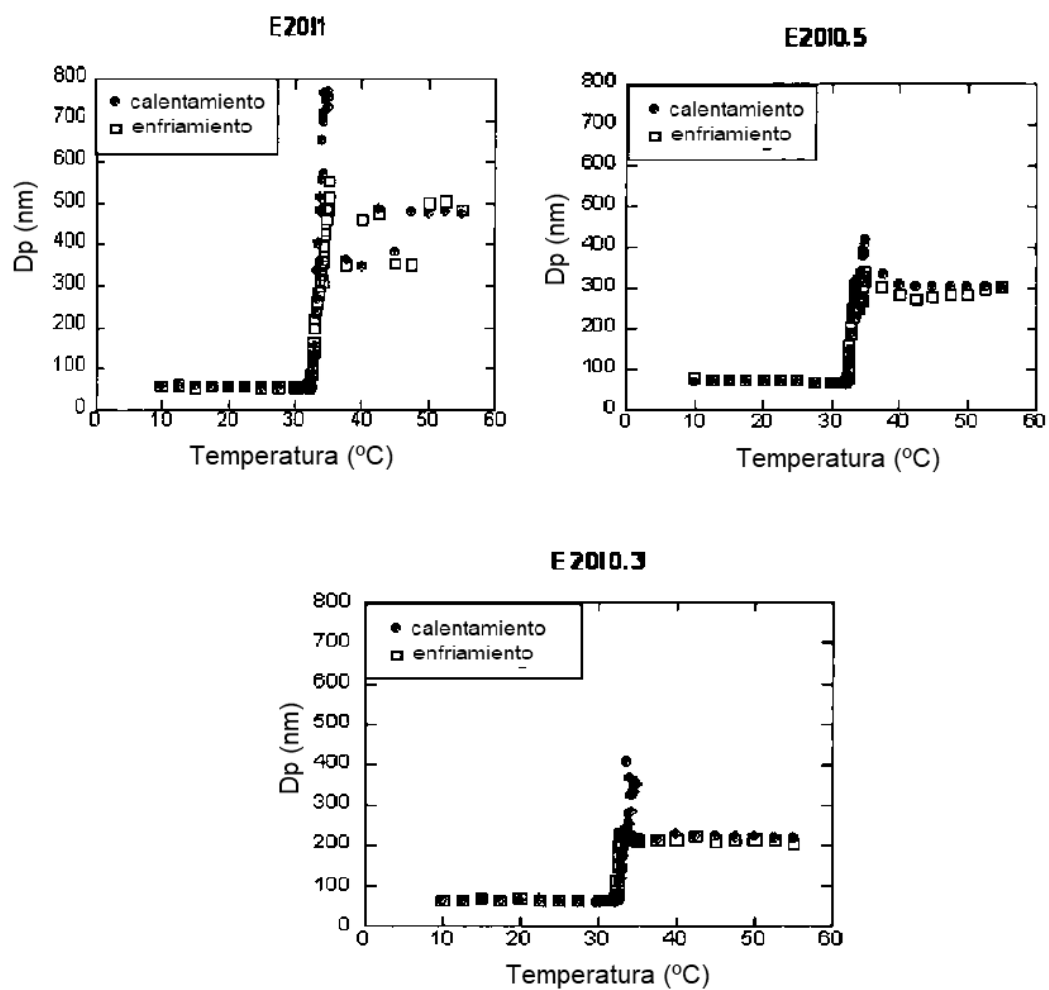


Figura 5

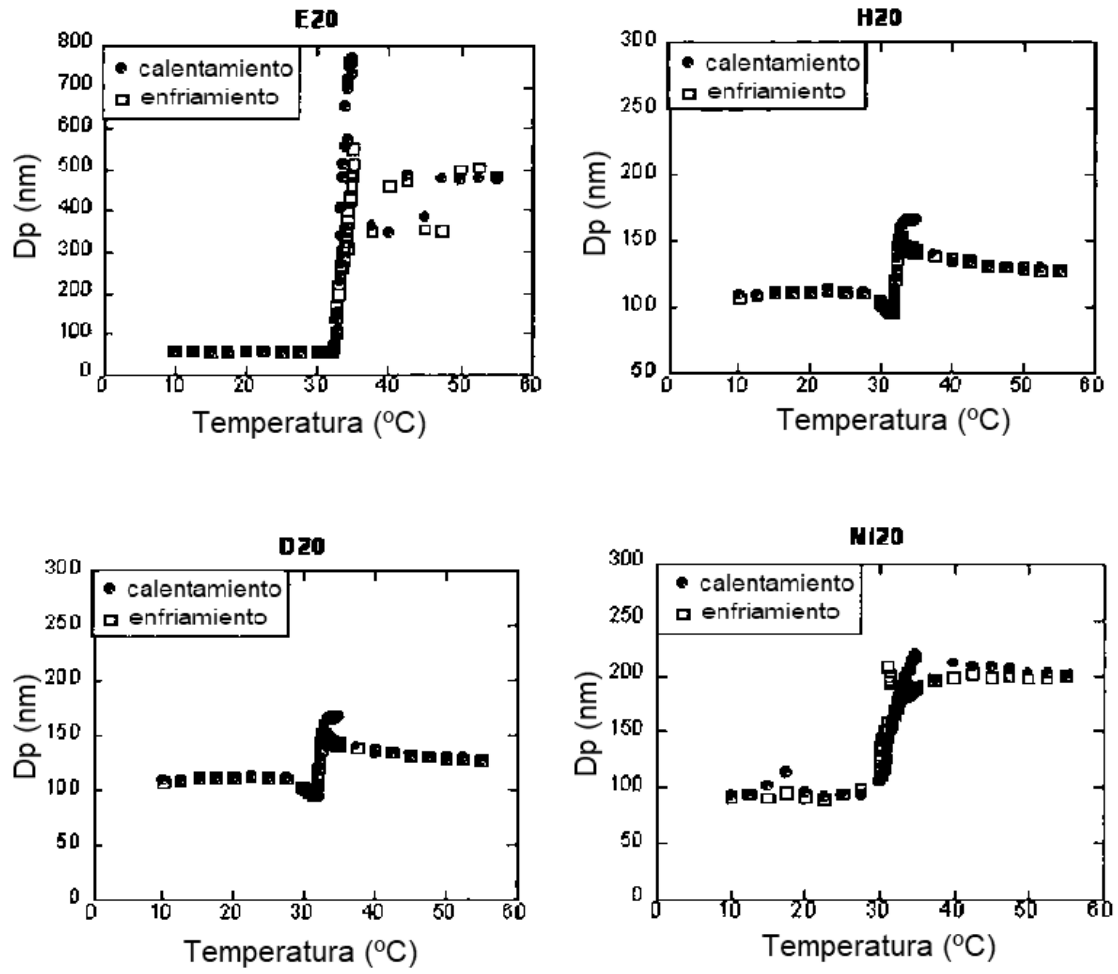


Figura 6

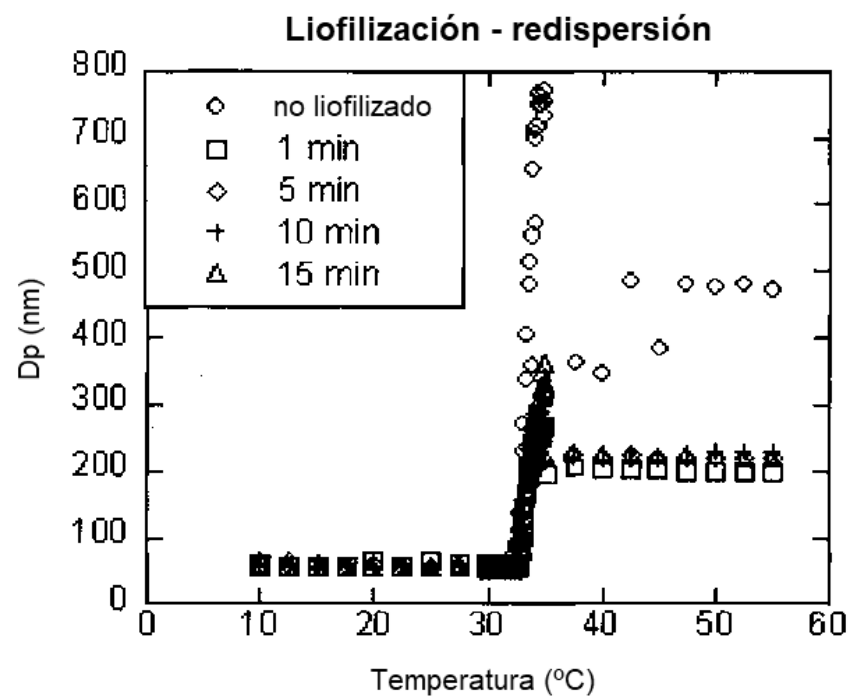


Figura 7