

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 047**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2009** **PCT/EP2009/060539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010** **WO10018223**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2009** **E 09781842 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2328554**

54 Título: **Encapsulado de fotosensibilizadores en nanoemulsiones**

30 Prioridad:

14.08.2008 FR 0855589

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2018

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MOURIER-ROBERT, VÉRONIQUE;
BIBETTE, JÉRÔME;
GOUTAYER, MATHIEU;
NAVARRO Y GARCIA, FABRICE y
TEXIER-NOGUES, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 671 047 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

Encapsulado de fotosensibilizadores en nanoemulsiones

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición de tipo nanoemulsión que se usa especialmente para administrar agentes terapéuticos lipofílicos o anfifílicos, un procedimiento para prepararla y usarla para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades, especialmente el cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

[0002] La nanomedicina constituye un nuevo campo creado por la fusión de la nanotecnología y la medicina, y es actualmente una de las vías más prometedoras para el desarrollo de terapias dirigidas eficaces, en particular para la oncología.

- 15 **[0003]** De hecho, las nanopartículas cargadas con agentes terapéuticos constituyen una solución ideal para superar la baja selectividad de los medicamentos, en particular de los medicamentos anticancerosos, ya que permiten tratar los tejidos cancerosos por medio del direccionamiento pasivo y/o activo, y esta es una forma de reducir los efectos secundarios graves.

- 20 **[0004]** Se han analizado una gran variedad de nanopartículas para su uso en aplicaciones terapéuticas y en la obtención de imágenes, tanto inorgánicas (por ejemplo, semiconductores, sílice u óxidos) como orgánicas (polímeros naturales o sintéticos, liposomas, nanoesferas, nanocápsulas, microesferas).

- [0005]** Se ha descubierto que las nanopartículas poliméricas tienen una citotoxicidad potencial asociada, en particular, con los residuos de disolventes orgánicos, así como dificultades de producción de reproducibilidad a gran escala y problemas de vida útil en el almacenamiento. Los liposomas son limitados en términos de estabilidad y grado de encapsulado de compuestos lipofílicos y su procedimiento de producción es complejo.

- [0006]** Como alternativa a las nanopartículas poliméricas, desde 1990 se ha centrado la atención en las nanopartículas lipídicas que comprenden un núcleo lipídico, a menudo basado en triglicéridos biodegradables, rodeado por una cubierta polimérica. La elección de lípidos biocompatibles, así como la posibilidad de producirlos sin disolventes, permite reducir notablemente su toxicidad (Muller, R. H., Eur J Pharm Biopharm 2000, 50, 161-177; Mehnert, W. y col., Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 47, 165-196). Suelen consistir en partículas lipídicas sólidas (SLN, una sigla para "nanopartículas lipídicas sólidas") donde el núcleo lipídico es sólido a temperatura ambiente. También pueden consistir en emulsiones, en las cuales las nanopartículas están formadas por una fase lipídica dispersada en una solución acuosa y estabilizada por tensioactivos.

- [0007]** Sin embargo, la tecnología de las SLN no permite controlar aún el crecimiento y existe una tendencia imprevista a la gelificación y a las transiciones polimórficas dinámicas inesperadas. Además, las SLN poseen una capacidad limitada de incorporarse en la estructura cristalina del lípido sólido (Mehnert, W. y col., Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 47, 165-196; Westesen, K. y col. International Journal of Pharmaceutics 1997, 151, 35 45; Westesen, K. y col., Journal of Controlled Release 1997, 48, 223-236).

- [0008]** El documento WO 01/64328 describe nanocápsulas lipídicas que consisten en un núcleo líquido o semilíquido rodeado por una cubierta sólida con un grosor de unos pocos nanómetros que puede encapsular un ingrediente farmacéutico activo. Las nanocápsulas se obtienen mediante un procedimiento térmico en el cual la mezcla de componentes oleosos y acuosos se somete a ciclos de temperatura (entre 60 y 85 °C) alrededor de la temperatura de inversión de fase (PIT) de la emulsión formada. La microemulsión obtenida después se somete a inactivación mediante el agregado de agua fría.

50

- [0009]** Este procedimiento requiere equipos específicos para detectar la inversión de fase de la emulsión y es incompatible con muchos agentes terapéuticos debido a la alta temperatura alcanzada. Además, la formación de una cubierta de superficie sólida dificulta el anclaje posterior de los ligandos de direccionamiento biológicos. Por otra parte, la inactivación requiere el agregado de grandes volúmenes de agua fría (dilución de 3 a 10 veces) y, por lo tanto, reduce considerablemente el rendimiento de las nanocápsulas. Además, la naturaleza química de los triglicéridos de ácidos grasos tiene un efecto notorio sobre la temperatura de inversión de fase, lo que limita su elección.

- [0010]** El documento US 2006/0292186 describe una formulación auto-nanoemulsionante anhidra para la

administración de ingredientes activos que son poco solubles en agua, tales como el paclitaxel. Estas formulaciones contienen una alta proporción de Tyloxapol y TPGS, tensioactivos poliméricos sintéticos.

5 **[0011]** El documento WO 2008/042841 describe preconcentrados de emulsión de paclitaxel que contienen un fosfolípido aniónico. Al dispersarse en una fase acuosa, la formulación forma una emulsión de aceite en agua en la cual las gotas poseen una carga negativa. Sin embargo, estas emulsiones son inestables y, por lo tanto, se deben preparar inmediatamente antes de la administración.

10 **[0012]** Además, Tarr y col., (1987) Pharm. Res. 4:162-165, presentan una formulación de paclitaxel en Intralipid, una emulsión para uso parenteral, pero la baja solubilidad del paclitaxel en aceite de soja (0,3 mg/ml) hace que este excipiente sea inestable.

15 **[0013]** La administración eficaz de agentes terapéuticos de tipo fotosensibilizador también constituye un desafío considerable en la terapia fotodinámica, que es una técnica prometedora para tratar diversos cánceres. El principio de esta técnica se basa en la introducción de un fotosensibilizador en el tejido tumoral y la conversión de este agente terapéutico con la ayuda de radiación de luz de una longitud de onda adecuada en un compuesto altamente citotóxico. Se ha planteado que el efecto citotóxico de los fotosensibilizadores se debe a la formación de oxígeno singlete después de la irradiación de luz.

20 **[0014]** La selectividad de este procedimiento depende de la acumulación selectiva del fotosensibilizador en el tejido tumoral frente a los tejidos sanos y, más concretamente, dentro de las propias células tumorales. En la actualidad, la baja selectividad tumoral de los agentes tras su inyección sistémica produce, para los pacientes, un período prolongado de fotosensibilidad cutánea de al menos 6 a 8 semanas.

25 **[0015]** Por lo tanto, el perfeccionamiento de los sistemas de administración de los fotosensibilizadores también constituye un desafío importante para el desarrollo de la terapia fotodinámica.

30 **[0016]** El documento WO 00/28971 describe formulaciones para la administración tópica de ácido 5-aminolaevulínico (5-ALA) para fototerapia y diagnóstico, que contiene una nanoemulsión. Por último, para reducir el período de fotosensibilidad cutánea, el documento US 2005/0215524 propone la administración de una emulsión de fosfolípidos antes, durante o después del tratamiento fototerapéutico mediante fotosensibilizadores. En los ejemplos, el fotosensibilizador se solubilizó directamente en los fosfolípidos inyectados, lo que promueve su rápida eliminación en el plasma y en la piel. Los siguientes documentos describen nanoemulsiones que comprenden Miglyol 812N como lípido y encapsulado de un fotosensibilizador: Primo y col. (Journal of Magnetism and Magnetic Materials 310 (2007) 2838-2840); Bourdon y col. (J. Photochem. Photobiol. B.: Biol. 55 (2000) 164-171); Bourdon y col. (Photochem. Photobiol. Sci., 2002, 1, 709-714); WO00/28971; Primo y col. (J. Nanosci. Nanotechnol. 2008, Vol. 8, N.º 1, 340-347).

40 **[PROBLEMA TÉCNICO]**

[0017] Por lo tanto, la formulación de altas dosis de agentes terapéuticos lipofílicos y anfifílicos en nanoemulsiones estables que permita una administración dirigida eficaz sigue siendo un desafío.

45 **[0018]** En la presente invención, se propone una formulación en la cual el agente terapéutico que es un fotosensibilizador está encapsulado en una nanoemulsión que tiene una fase oleosa con una composición específica.

[RESUMEN DE LA INVENCION]

50 **[0019]** La presente invención describe una formulación novedosa de agentes terapéuticos que son fotosensibilizadores mediante encapsulado en una nanoemulsión de aceite en agua.

55 **[0020]** En virtud de una formulación específica, la nanoemulsión de acuerdo con la invención es estable y permite alcanzar un alto grado de encapsulado de un agente terapéutico que es un fotosensibilizador. La nanoemulsión también permite que se logre un alto grado de interiorización en las células vinculado con un diámetro promedio pequeño de la fase dispersada. Su formulación soporta una alta concentración de tensioactivo en la fase continua y es sorprendentemente sólida, ya que permanece estable y presenta una biodistribución del agente terapéutico que no depende de la composición. Por último, resulta valiosa ya que se puede formular de modo que la superficie de la fase dispersada tenga un potencial zeta bajo, incluso de cero. El potencial zeta es un parámetro

clave que afecta la biodistribución de la nanoemulsión. Tras el contacto con las células, un potencial zeta positivo por lo tanto promueve la endocitosis. La superficie de la fase dispersada tiene un potencial zeta cuyo valor absoluto es inferior a 20 mV. En particular, las nanoemulsiones presentan de forma ventajosa excelente estabilidad coloidal durante el almacenamiento (>3 meses) y una buena capacidad de encapsular el agente terapéutico, así como una mayor concentración en la fase dispersada. Durante la aplicación, también se ha observado una vida en plasma prolongada después de la inyección intravenosa de las nanopartículas en el organismo (de carácter recubierto).

[0021] Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un agente terapéutico que es una formulación fotosensibilizadora en forma de una nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase oleosa dispersada, en donde la fase oleosa comprende además del agente terapéutico, al menos un lípido anfifílico y al menos un lípido solubilizante, y en donde la fase acuosa comprende al menos un cotensioactivo polialcoxilado.

[0022] El lípido anfifílico es preferentemente un fosfolípido.

[0023] El lípido solubilizante comprende glicéridos de ácido graso saturado que comprenden entre 12 y 18 átomos de carbono.

[0024] La fase oleosa además puede comprender al menos un aceite, preferentemente un aceite que tenga un equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de entre 3 y 6, en particular un aceite seleccionado de aceite de soja y aceite de linaza.

[0025] El cotensioactivo comprende preferentemente al menos una cadena formada de unidades de óxido de etileno u óxido de etileno y unidades de óxido de propileno. En particular, el cotensioactivo se puede seleccionar de los compuestos conjugados polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG/PE), éteres de ácido graso y polietilenglicol y ésteres de ácido graso y polietilenglicol y copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno.

[0026] El agente terapéutico puede ser, en particular, un ingrediente farmacéutico activo o un fotosensibilizador.

[0027] De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar un agente terapéutico que es una formulación fotosensibilizadora en forma de una nanoemulsión, que comprende al menos una fase acuosa continua y al menos una fase oleosa dispersada, que comprende las etapas de:

- (i) preparar la fase oleosa que comprende al menos un lípido solubilizante, un lípido anfifílico y el agente terapéutico;
- (ii) preparar una fase acuosa que contenga un cotensioactivo polialcoxilado;
- (iii) dispersar la fase oleosa en la fase acuosa bajo el efecto de una fuerza de corte suficiente para formar una nanoemulsión; y
- (iv) recuperar la nanoemulsión así formada.

[0028] El efecto de fuerza de corte se produce preferentemente mediante sonicación. La fase oleosa se prepara de forma ventajosa colocando todos o algunos de los constituyentes en solución en un disolvente adecuado y evaporando posteriormente el disolvente.

[0029] De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de una formulación de acuerdo con la invención para la administración de un agente terapéutico que es un fotosensibilizador a seres humanos o animales para tratar una enfermedad o dolencia.

[0030] El procedimiento de producción de acuerdo con la invención permite producir nanoemulsiones que comprenden una fase dispersada muy pequeña de forma simple, rápida y económica. El procedimiento también es sólido y se puede realizar fácilmente a escala industrial. Además, no utiliza, o solo utiliza muy pocos, disolventes orgánicos y se puede implementar con productos aprobados para inyección humana. Por último, solo se necesita calefacción moderada y por lo tanto el procedimiento de producción se puede utilizar incluso para ingredientes activos lábiles.

[DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION]

[Definiciones]

[0031] Dentro del significado del presente documento, el término "nanoemulsión" significa una composición que tiene al menos dos fases, en general una fase oleosa y una fase acuosa, donde el tamaño promedio de la fase dispersada es menos de 1 micrón, preferentemente entre 10 y 500 nm y en particular entre 20 y 100 nm, y más preferentemente entre 20 y 70 nm (véase el artículo de C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar y M. J. Garcia-Celma, Curr Opin Colloid In, 2005, 10, 102-110).

[0032] La expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier compuesto que se pueda utilizar en el tratamiento de una enfermedad y que actúe de forma química, tal como ingredientes farmacéuticos activos, de forma física o biológica, pero no incluye agentes de diagnóstico.

[0033] El término "gota" abarca gotas de aceite líquido como tales, así como las partículas sólidas de emulsiones de aceite en agua en las cuales la fase oleosa es sólida. En el último caso, la expresión "emulsión sólida" también se suele utilizar.

[0034] Dentro del significado del presente documento, el término "lípidos" indica todas las grasas y aceites o sustancias que contienen ácidos grasos presentes en las grasas animales y los aceites vegetales. Son moléculas hidrofóbicas o anfífilas formadas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno y que tienen una densidad inferior a la del agua. Los lípidos pueden estar en estado sólido a temperatura ambiente (25 °C), como en las ceras, o líquido, como en los aceites.

[0035] El término "fosfolípido" se refiere a lípidos que tienen un grupo fosfato, en particular fosfoglicéridos. A menudo, los fosfolípidos comprenden un extremo hidrofílico formado por el grupo fosfato opcionalmente sustituido y dos extremos hidrofóbicos formados por cadenas de ácidos grasos. Los fosfolípidos específicos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y esfingomielina.

[0036] El término "lecitina" se refiere a fosfatidilcolina, es decir, un lípido formado a partir de una colina, un fosfato, un glicerol y dos ácidos grasos. En sentido más amplio, incluye fosfolípidos extraídos de fuentes vivas, de origen vegetal o animal, siempre que consistan mayoritariamente en fosfatidilcolina. Estas lecitinas consisten generalmente en mezclas de lecitinas que poseen diferentes ácidos grasos.

[0037] La expresión "ácidos grasos" se refiere a ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una cadena de carbono de al menos 4 átomos de carbono. Los ácidos grasos naturales tienen una cadena de carbono de entre 4 y 28 átomos de carbono (generalmente un número par). Los ácidos grasos de cadena larga son aquellos de entre 14 y 22 átomos de carbono y los ácidos grasos de cadena muy larga son aquellos que tienen más de 22 átomos de carbono.

[0038] El término "tensioactivo" significa compuestos que tienen una estructura anfífila que les proporciona una afinidad específica para las interfaces de tipo aceite/agua y agua/aceite que les permite reducir la energía libre de estas interfaces y estabilizar los sistemas dispersados.

[0039] El término "cotensioactivo" significa un tensioactivo que actúa con otro tensioactivo para reducir adicionalmente la energía de la interfaz.

[0040] La expresión "ligando biológico" significa cualquier molécula que reconoce, de una manera específica, un receptor dispuesto generalmente en la superficie de las células.

[Emulsión]

[0041] De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un agente terapéutico que es una formulación fotosensibilizadora en forma de una nanoemulsión, que comprende al menos una fase acuosa y al menos una fase oleosa, donde la fase oleosa también comprende además del agente terapéutico, al menos un lípido anfífilo y al menos un lípido solubilizante, y donde la fase acuosa comprende un cotensioactivo polialcoxilado.

[0042] Por lo tanto, la emulsión es una emulsión de tipo aceite en agua. La emulsión puede ser simple o múltiple, en particular mediante la inclusión de una segunda fase acuosa en la fase dispersada.

[0043] Algunos agentes terapéuticos que también son capaces de encapsularse en la nanoemulsión de acuerdo con la invención comprenden, en particular, ingredientes activos que actúan de forma química, biológica o física. Por lo tanto, pueden ser ingredientes farmacéuticos activos o agentes biológicos tales como ADN, proteínas,

péptidos o anticuerpos, así como agentes útiles en la terapia física tales como los compuestos utilizados para la termoterapia, compuestos que liberan oxígeno singlete cuando son excitados por la luz (lo que es útil para la fototerapia) y agentes radiactivos. Preferentemente, son ingredientes activos que se administran mediante inyección.

- 5 **[0044]** De acuerdo con su afinidad lipofílica o anfifílica, el agente terapéutico será encapsulado por la fase dispersada o se ubicará en la interfaz entre dos fases.

- [0045]** La naturaleza de los agentes terapéuticos encapsulados en la nanoemulsión no se encuentra particularmente limitada. Sin embargo, la nanoemulsión tiene un valor especial para los compuestos poco solubles
10 que son difíciles de formular en los sistemas de administración convencionales y para los ingredientes activos luminiscentes útiles para la fototerapia, cuyo rendimiento cuántico se debe conservar.

- [0046]** Debido a las condiciones moderadas para el procedimiento preparativo, la formulación descrita tiene especial valor para encapsular los agentes terapéuticos que se degradan a temperaturas altas.

- 15 **[0047]** Algunos ejemplos de ingredientes farmacéuticos activos que tienen valor como agentes terapéuticos son, en particular, los agentes utilizados en el tratamiento del SIDA, los agentes utilizados en el tratamiento de las enfermedades cardíacas, analgésicos, anestésicos, anorexígenos, antihelmínticos, antialérgicos, fármacos antiangénicos, antiarrítmicos, anticolinérgicos, anticoagulantes, antidepresivos, antidiabéticos, antidiuréticos, antieméticos, anticonvulsivos, agentes antifúngicos, antihistamínicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, fármacos antimigrañas, fármacos antimuscarínicos, antimicobacterianos, anticancerosos, incluidos antiparkinsonianos, fármacos antitiroideos, antivirales, astringentes, agentes bloqueadores, hemoderivados, sustitutos sanguíneos, agentes inotrópicos cardíacos, agentes cardiovasculares, agentes para el sistema nervioso central, quelantes, agentes quimioterapéuticos, factores de crecimiento hematopoyéticos, corticosteroides, antitusígenos, agentes
20 dermatológicos, diuréticos, dopaminérgicos, inhibidores de la elastasa, agentes endocrinos, alcaloides del cornezuelo de centeno, expectorantes, agentes gastrointestinales, agentes genitourinarios, iniciadores del factor de la hormona del crecimiento, hormonas del crecimiento, agentes hematológicos, agentes hematopoyéticos, hemostáticos, hormonas, agentes inmunológicos, inmunosupresores, interleucinas, análogos de la interleucina, agentes reguladores de lípidos, gonadolibarina, miorrelajantes, antagonistas narcóticos, nutrientes, agentes
25 nutritivos, terapias oncológicas, nitratos orgánicos, vagomiméticos, prostaglandinas, antibióticos, agentes renales, agentes respiratorios, sedantes, hormonas sexuales, estimulantes, simpaticomiméticos, antiinfecciosos sistémicos, tacrolimus, agentes trombolíticos, agentes tiroideos, tratamientos para las dificultades de atención, vacunas, vasodilatadores, xantinas y agentes reductores del colesterol. Los de particular interés son los agentes anticancerosos, tales como taxol (paclitaxel), doxorubicina y cisplatina.

- 35 **[0048]** Algunos ejemplos de agentes físicos son, en particular, isótopos radioactivos y fotosensibilizadores.

- [0049]** Algunos ejemplos de fotosensibilizadores son, en particular, aquellos que pertenecen a la clase de tetrapirroles, tales como porfirinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, clorinas, purpurinas, porfírenos, feoforbidos o
40 aquellos que pertenecen a la clase de texafirinas o hipericinas. Algunos ejemplos de fotosensibilizadores de primera generación son la hematoporfirina y una mezcla de derivados de hematoporfirina (HpD) (comercializados con la marca Photofrin® por Axcan Pharma). Algunos ejemplos de fotosensibilizadores de segunda generación son cloro de meta-tetra-hidroxifenilo (mTHPC; marca Foscan®, Biolitec AG) y monoácido derivado del anillo A de benzoporfirina (BPD-MA comercializado con la marca Visudyne® por QLT y Novartis Ophthalmics). Las formulaciones
45 de los fotosensibilizadores de segunda generación que se asocian con estos fotosensibilizadores, una molécula (lípidos, péptidos, azúcar, etc.) que actúan como un transportador y permiten el direccionamiento selectivo en el tejido tumoral se denominan fotosensibilizadores de tercera generación.

- [0050]** Algunos ejemplos de agentes biológicos son oligonucleótidos, ADN, ARN, ARNip, péptidos y
50 proteínas.

- [0051]** Evidentemente, el agente terapéutico se puede formular directamente en su forma activa o en forma de un profármaco. Además, es posible que múltiples agentes terapéuticos se formulen juntos en la nanoemulsión.

- 55 **[0052]** La cantidad de agente terapéutico depende de la aplicación prevista en cuestión, así como de la naturaleza del agente. Sin embargo, el intento se realiza generalmente para formular la nanoemulsión con una concentración máxima de agente terapéutico, en particular cuando se utilizan agentes terapéuticos poco solubles, para limitar el volumen y/o la duración de la administración al paciente.

[0053] Ahora bien, se ha comprobado que la presencia del lípido solubilizante en fase oleosa permite incorporar una gran cantidad de compuestos, incluso hidrofóbicos o anfifílicos.

[0054] La formulación de acuerdo con la invención contendrá a menudo una cantidad de entre el 0,001 y el 30 % en peso, preferentemente entre el 0,01 y el 20 % en peso, o incluso más preferentemente entre el 0,1 y el 10 % en peso de agente terapéutico.

[0055] De forma ventajosa, los agentes terapéuticos se incorporan en la emulsión en forma de solución, y el disolvente después se separa, por ejemplo, mediante evaporación. La solución contiene el agente terapéutico en una cantidad variable que puede alcanzar su límite de solubilidad. La elección del disolvente depende de la solubilidad de cada agente terapéutico. Los disolventes empleados pueden ser, por ejemplo, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, hexano, ciclohexano, DMSO, DMF o incluso tolueno. Se utiliza preferentemente un disolvente volátil, preferentemente no tóxico para los seres humanos.

[0056] De acuerdo con la invención, la fase oleosa de la nanoemulsión además comprende al menos un lípido anfifílico y al menos un lípido solubilizante.

[0057] De modo que para formar una nanoemulsión estable, generalmente, es necesario incluir en la composición al menos un lípido anfifílico como tensioactivo. La naturaleza anfifílica del tensioactivo hace que las gotas de aceite sean estables dentro de la fase acuosa continua.

[0058] Los lípidos anfifílicos comprenden una parte hidrofílica y una parte lipofílica. Se seleccionan generalmente de compuestos de los cuales la parte lipofílica comprende una cadena saturada o insaturada lineal o ramificada que tiene entre 8 y 30 átomos de carbono. Se pueden seleccionar de fosfolípidos, colesterol, lisolípidos, esfingomielinas, tocoferoles, glucolípidos, estearilaminas y cardiolipinas, y pueden ser de origen natural o sintético; moléculas formadas de un ácido graso acoplado a un grupo hidrofílico por una función éter o éster, tal como ésteres de sorbitán, por ejemplo, monooleato de sorbitán y monolaurato de sorbitán comercializados con la marca Span® por Sigma; lípidos polimerizados; lípidos conjugados con cadenas cortas de óxido de polietileno (PEG), tales como los tensioactivos no iónicos comercializados con las marcas Tween® por ICI Americas, Inc. y Triton® por Union Carbide Corp.; ésteres de azúcar tales como monolaurato de sacarosa y dilaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa y dipalmitato de sacarosa, monoestearato de sacarosa y diestearato de sacarosa; y dichos tensioactivos se pueden utilizar solos o en una mezcla.

[0059] La lecitina es el lípido anfifílico preferido.

[0060] En una realización específica, la totalidad o parte del lípido anfifílico puede tener una función reactiva, tal como un grupo maleimida, tiol, amina, éster, oxiamina o aldehído. La presencia de funciones reactivas permite que los compuestos funcionales se injerten en la interfaz. El lípido anfifílico reactivo se incorpora en la capa formada en la interfaz estabilizando la fase dispersada, por ejemplo, donde puede acoplarse con un compuesto reactivo presente en la fase acuosa.

[0061] En general, la fase oleosa comprenderá entre el 0,01 y el 99 % en peso, preferentemente entre el 5 y el 75 % en peso, en particular entre el 20 y el 60 % en peso y más especialmente entre el 33 y el 45 % en peso de lípido anfifílico.

[0062] La cantidad de lípido anfifílico ayuda de forma ventajosa a controlar el tamaño de la fase dispersada de la nanoemulsión obtenida.

[0063] La emulsión de acuerdo con la invención además comprende un lípido solubilizante. La principal tarea de este compuesto es solubilizar el lípido anfifílico, que es poco soluble, en la fase oleosa de la nanoemulsión.

[0064] El lípido solubilizante es un lípido que tiene una afinidad suficiente por el lípido anfifílico para permitir que se solubilice. El lípido solubilizante es preferentemente sólido a temperatura ambiente.

[0065] En el caso en el que el lípido anfifílico sea un fosfolípido, los posibles lípidos solubilizantes son, en particular, derivados de glicerol, especialmente glicéridos obtenidos mediante esterificación del glicerol con ácidos grasos.

[0066] El lípido solubilizante utilizado se selecciona de forma ventajosa según el lípido anfifílico utilizado. Por

lo general, tendrá una estructura química cercana para provocar la solubilización deseada. Puede ser un aceite o una cera. El lípido solubilizante es preferentemente sólido a temperatura ambiente (20 °C), pero líquido a temperatura corporal (37 °C).

5 **[0067]** Los lípidos solubilizantes preferidos, en particular para los fosfolípidos, son glicéridos de ácidos grasos, en particular glicéridos de ácidos grasos saturados, y en particular glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden entre 8 y 18 átomos de carbono, incluso más preferentemente entre 12 y 18 átomos de carbono. De forma ventajosa, interviene una mezcla de glicéridos diferentes.

10 **[0068]** Preferentemente, intervienen glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden al menos el 10 % en peso de ácidos grasos de C12, al menos el 5 % en peso de ácidos grasos de C14, al menos el 5 % en peso de ácidos grasos de C16 y al menos el 5 % en peso de ácidos grasos de C18. El lípido solubilizante comprende una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos de C8, entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos de C10, entre el 10 % y el 70 % en peso de ácidos grasos de C12, entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C14, entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C16 y entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C18. Se prefieren particularmente las mezclas de glicéridos semisintéticas comercializadas por Gattefossé con la marca Suppocire® NC, que son sólidas a temperatura ambiente y han sido aprobadas para inyección en seres humanos. Los glicéridos Suppocire® tipo N se obtienen mediante esterificación directa de ácidos grasos y glicerol. Estos son glicéridos semisintéticos de ácidos grasos saturados de C8 a C18, de los cuales la composición cuali-cuantitativa se muestra en la siguiente tabla.

[0069] Los lípidos solubilizantes mencionados anteriormente permiten obtener una formulación en forma de una nanoemulsión que es estable de manera ventajosa. Sin pretender recurrir a una teoría específica, se supone que los lípidos solubilizantes mencionados anteriormente permiten obtener gotas en la nanoemulsión que tienen un núcleo amorfo. El núcleo así obtenido tiene una mayor viscosidad interna y no presenta cristalinidad. La cristalización tiene un efecto adverso sobre la estabilidad de la nanoemulsión, ya que generalmente provoca que las gotas se acumulen y/o provoca que las moléculas encapsuladas se expulsen de las gotas. Estas propiedades por lo tanto promueven la estabilidad física de la nanoemulsión y la estabilidad del encapsulado del agente terapéutico con el tiempo.

30 **[0070]** La cantidad de lípido solubilizante puede variar ampliamente en función del tipo y la cantidad de lípido anfílico presente en la fase oleosa. En general, la fase oleosa comprenderá entre el 1 y el 99 % en peso, preferentemente entre el 5 y el 80 % en peso y en particular entre el 40 y el 75 % en peso de lípido solubilizante.

35 Tabla 1: composición de ácido graso de Suppocire NC® de Gattefossé

Longitud de la cadena	[% en peso]
C8	0,1 a 0,9
C10	0,1 a 0,9
C12	25 a 50
C14	10 a 24,9
C16	10 a 24,9
C18	10 a 24,9

[0071] La fase oleosa además puede comprender uno o más aceites adicionales.

40 **[0072]** Los aceites utilizados tienen preferentemente un equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de menos de 8 e incluso más preferentemente de entre 3 y 6. De forma ventajosa, los aceites se utilizan sin ninguna modificación química o física antes de la formación de la emulsión.

[0073] En las aplicaciones propuestas, los aceites se pueden seleccionar de aceites biocompatibles, en particular de aceites de origen natural (vegetal o animal) o sintético. Los aceites de este tipo incluyen, en particular, aceites de origen vegetal natural, lo que incluye, en particular, aceites de soja, linaza, palma, cacahuete, oliva, semilla de uva y de girasol; y aceites sintéticos, incluidos, en particular, triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos. Estos aceites se pueden encontrar en su forma natural, refinados o interesterificados.

50 **[0074]** Los aceites preferidos son el aceite de soja y el aceite de linaza.

[0075] En general, si se encuentra presente, el aceite está contenido en la fase oleosa en una cantidad que

oscila entre el 1 y el 80 % en peso, preferentemente entre el 5 y el 50 % en peso y en particular entre el 10 y el 30 % en peso.

[0076] La fase oleosa, además, puede contener otros aditivos, tales como colorantes, estabilizantes, conservantes, fluoróforos, agentes de contraste para imagenología, nanocristales inorgánicos (por ejemplo, oro, óxido de hierro o nanocristales semiconductores) u otros ingredientes activos en una cantidad adecuada.

[0077] La fase oleosa para la fase dispersada de la emulsión se puede preparar simplemente mezclando los constituyentes, calentándolos si fuera necesario hasta que todos los constituyentes se hayan derretido.

[0078] La fase acuosa utilizada en el procedimiento de acuerdo con la invención consiste preferentemente en agua y/o un amortiguador, tal como un amortiguador de fosfato, por ejemplo, PBS ("solución salina amortiguada con fosfato") u otra solución salina, en particular, cloruro de sodio.

[0079] Además, comprende opcionalmente otros ingredientes, incluido un tensioactivo. El tensioactivo estabiliza la nanoemulsión.

[0080] El tensioactivo también puede tener otros efectos en la aplicación prevista de la nanoemulsión. En particular, se puede injertar para transportar un ligando de direccionamiento.

[0081] Los cotensioactivos que se pueden utilizar en las emulsiones de acuerdo con la presente invención son preferentemente tensioactivos solubles en agua. Los tensioactivos solubles en agua son preferentemente alcoxilados y comprenden preferentemente al menos una cadena compuesta por unidades de óxido de etileno (PEO o PEG) o unidades de óxido de etileno y óxido de propileno. Preferentemente, la cantidad de unidades en la cadena varía entre 2 y 500.

[0082] Algunos ejemplos de cotensioactivos incluyen, en particular, los compuestos conjugados polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE), éteres de ácido graso y polietilenglicol, tales como los productos comercializados con la marca Brij® (por ejemplo, Brij® 35, 58, 78 o 98) por ICI Americas Inc., ésteres de ácido graso y polietilenglicol, tales como los productos comercializados con la marca Myrj® por ICI Americas Inc. (por ejemplo, Myrj® 45, 52, 53 o 59) y copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno tales como los productos comercializados con la marca Pluronic® por BASF AG (por ejemplo, Pluronic® F68, F127, L64, L61, 10R4, 17R2, 17R4, 25R2 o 25R4) o los productos comercializados con la marca Synperonic® por Unichema Chemie BV (por ejemplo, Synperonic® PE/F68, PE/L61 o PE/L64).

[0083] La fase acuosa comprende entre el 0,01 y el 50 % en peso, preferentemente entre el 1 y el 30 % en peso, y en particular entre el 5 y el 20 % en peso de un cotensioactivo.

[0084] En una realización preferida, la fase continua además comprende un agente espesante tal como un glicerol, un sacárido, un oligosacárido o un polisacárido, una goma o incluso una proteína; preferentemente glicerol. De hecho, el uso de una fase continua de mayor viscosidad facilita la emulsificación y permite reducir el tiempo de sonicación.

[0085] La fase acuosa comprende de manera ventajosa entre el 0 y el 50 % en peso, preferentemente entre el 1 y el 30 % en peso, y en particular entre el 5 y el 20 % en peso de un agente espesante.

[0086] Naturalmente, la fase acuosa además puede comprender otros aditivos, tales como colorantes, estabilizantes y conservantes en cantidades adecuadas.

[0087] La fase acuosa para la fase continua de la emulsión se puede preparar simplemente mezclando los diferentes constituyentes con el medio acuoso seleccionado.

[Procedimiento de preparación]

[0088] La nanoemulsión descrita arriba se puede preparar fácilmente dispersando cantidades adecuadas de fase oleosa y fase acuosa bajo el efecto de una fuerza de corte.

[0089] En el procedimiento de acuerdo con la invención, los diferentes constituyentes oleosos y el agente terapéutico se mezclan inicialmente para preparar una premezcla oleosa para la fase dispersada de la emulsión. La

mezcla se puede facilitar opcionalmente colocando uno de los constituyentes o la mezcla completa en solución en un disolvente orgánico adecuado. El disolvente orgánico después se evapora para obtener una premezcla oleosa homogénea para la fase dispersada.

5 **[0090]** Además, se prefiere producir la premezcla a una temperatura a la cual todos los ingredientes sean líquidos.

[0091] De acuerdo con una realización preferida, la fase dispersada de la nanoemulsión se injerta en la superficie con moléculas beneficiosas, tales como ligandos biológicos. Un procedimiento de injerto de este tipo
10 permite reconocer células específicas (por ejemplo, células tumorales como se describen, por ejemplo, en el artículo de S. Achilefu, Technology in Cancer Research & Treatment, 2004, 3, 393-408) u órganos del cuerpo específicos.

[0092] El proceso de injerto superficial se logra preferentemente mediante el acoplamiento de moléculas o sus precursores con un compuesto anfifílico, en particular con el cotensioactivo. En este caso, el compuesto anfifílico
15 actúa como un espaciador que permite que las moléculas de direccionamiento se dispongan en la superficie. Este acoplamiento se puede realizar antes o después de la emulsificación. Es posible que se prefiera el último caso cuando las reacciones químicas utilizadas son compatibles con la estabilidad coloidal de las emulsiones, en particular con respecto al pH. El pH durante la reacción de acoplamiento es preferentemente de entre 5 y 11.

20 **[0093]** Las moléculas beneficiosas pueden ser, por ejemplo:

- ligandos de direccionamiento biológicos, tales como anticuerpos, péptidos, sacáridos, aptámeros, oligonucleótidos o compuestos, tales como ácido fólico;
- un agente recubierto: una sustancia que se agrega para hacer que la nanoemulsión sea invisible para el sistema
25 inmunitario, para aumentar el tiempo de circulación dentro del organismo y para ralentizar su eliminación.

[0094] También es posible introducir dentro de las nanopartículas, en la superficie o adsorbido dentro, mediante un enlace covalente o no:

- 30 - agentes de imagenología, en particular para RM (imagenología por resonancia magnética), PET (tomografía por emisión de positrones), SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotones simple), ultrasonografía, radiografía, tomografía X e imagenología óptica (fluorescencia, bioluminiscencia, difusión, etc.); y/o
- los agentes terapéuticos definidos arriba.

35 **[0095]** La proporción de fase oleosa y fase acuosa es altamente variable. Sin embargo, normalmente, las nanoemulsiones se prepararán con entre el 1 y el 50 %, preferentemente entre el 5 y el 40 %, y en particular entre el 10 y el 30 % en peso de fase oleosa y entre el 50 y el 99 %, preferentemente entre el 60 y el 95 % y en particular entre el 70 y el 90 % en peso de fase acuosa.

40 **[0096]** De forma ventajosa, la fase oleosa se dispersa en la fase acuosa en estado líquido. Si una de las fases se solidifica a temperatura ambiente, es preferible realizar la mezcla con una, o preferentemente las dos fases calentadas a una temperatura mayor o igual que la temperatura de fusión.

[0097] La emulsificación bajo el efecto de la fuerza de corte se produce preferentemente utilizando un
45 sonicador o un microfluidificador. Preferentemente, la fase acuosa y después la fase oleosa se introducen en un receptáculo cilíndrico adecuado en las proporciones deseadas y el sonicador se sumerge en el medio y se enciende durante un tiempo suficiente como para obtener una nanoemulsión, generalmente algunos minutos.

[0098] Esto produce una nanoemulsión homogénea en la cual el diámetro promedio de las gotas de aceite es
50 mayor que 10 nm y menor que 200 nm, preferentemente es de entre 20 y 50 nm. El valor absoluto del potencial zeta es preferentemente inferior que 20 mV, es decir, es de entre -20 y 20 mV.

[0099] Antes del acondicionamiento, se puede diluir y/o esterilizar la emulsión, por ejemplo, mediante filtración o mediante diálisis. Esta etapa permite eliminar cualquier acumulación que se pueda haber formado
55 durante la preparación de la emulsión.

[0100] La emulsión obtenida de este modo queda lista para usar, después de una dilución si fuera necesario.

[PROCEDIMIENTOS DE USO]

[0101] La formulación de acuerdo con la invención se puede utilizar tal como se encuentra o adaptada para la aplicación prevista, por ejemplo, mediante dilución, para la administración de los agentes terapéuticos a seres humanos o animales.

5

[0102] Debido al hecho de que se puede preparar de forma exclusiva a partir de constituyentes aprobados para seres humanos, la formulación es particularmente adecuada para la administración parenteral. Sin embargo, también es posible que la administración se logre por otras vías, en particular, por vía oral o tópica.

10 **[0103]** La formulación descrita permite por lo tanto un procedimiento simple para administrar agentes terapéuticos que son necesarios para tratar enfermedades, tales como el cáncer, mediante quimioterapia o fototerapia en particular.

[0104] La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento terapéutico que comprende la administración de una cantidad terapéutica eficaz de la formulación tal como se define arriba a un mamífero, preferentemente un ser humano, que lo necesite.

[0105] La invención se describirá más detalladamente en lo sucesivo mediante los ejemplos que siguen y las figuras adjuntas, en las cuales:

20

Figura 1: muestra la densidad óptica a 650 nm de las nanoemulsiones de mTHPP y mTPC de acuerdo con los ejemplos 2A y 2C con una velocidad de carga respectiva de entre 0 y 1000 μM de mTHPP y de entre 0 y 2000 μM de mTPC, antes y después de la diálisis, determinada por un espectrofotómetro CARY 300 - SCAN y representada respectivamente en A y B. Las ecuaciones de las líneas rectas de correlación lineal antes de la diálisis son, para mTHPP: $y=0,0042x+0,2331$ ($R=0,99$) y para mTPC: $y=0,0049x+0,023$ ($R=0,99$), las de las líneas rectas después de la diálisis son, para mTHPP: $y=0,0056x+0,1503$ ($R=0,99$) y para mTPC: $y=0,0059x+0,0584$ ($R=0,99$);

Figura 2: muestra gráficas de barras del diámetro promedio de la fase dispersada de las emulsiones de acuerdo con los ejemplos 2A-2C medidos después de la diálisis en el Zetasizer (instrumentos Malvern) (muestras diluidas a 1:1000 en PBS 0,1X);

Figura 3: muestra imágenes de las células obtenidas en el ejemplo 3 observadas en microscopía confocal en el infrarrojo cercano. Los granos negros representan la fluorescencia emitida por mTHPP;

35 Figura 4: muestra ratones que poseen un tumor subcutáneo de tipo Ts/Apc (10 millones de células). Observación 24 h después de la inyección iv en ratones anestesiados de 200 μl de solución de nanoemulsión con fluoróforo 50 μM (A: nanoemulsiones que encapsulan DiD; B: nanoemulsiones que encapsulan ICG);

Figura 5: muestra el desarrollo de la proporción entre la señal de fluorescencia emitida por el tumor y la señal de fluorescencia emitida por la piel en función del tiempo para las nanoemulsiones funcionalizadas por cRGD y las nanoemulsiones no funcionalizadas y

Figura 6: muestra el diámetro promedio de la fase dispersada de diversas nanoemulsiones en función de la molécula incorporada en el núcleo lipofílico.

45

Figura 7: muestra dos espectros ^1H NMR de las nanoemulsiones después de la producción para las temperaturas $T=10^\circ\text{C}$ y $T=60^\circ\text{C}$ (ejemplo 6).

Figura 8: muestra termogramas (flujo de calor (W/g) en función de la temperatura en $^\circ\text{C}$) obtenidos mediante calorimetría de escaneo diferencial (DSC) de las nanoemulsiones después de la producción (a) y después de 4 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (b) utilizando un instrumento Universal V3.8B TA (ejemplo 6).

Figura 9: muestra el desarrollo del tamaño de las gotas (en nm) de la nanoemulsión en función del tiempo (en días) para tres nanoemulsiones a 40°C . Los diamantes representan una nanoemulsión que no contiene lípido solubilizante y que comprende aceite, los triángulos representan una nanoemulsión que comprende una mezcla 50:50 del lípido solubilizante y aceite y los círculos representan una nanoemulsión que no contiene aceite y que contiene lípido solubilizante (ejemplo 6).

EJEMPLOS

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Preparación de una nanoemulsión que encapsula paclitaxel

5

[0106] Se preparó un lote de 2 ml de nanoemulsión que encapsula paclitaxel (carga de paclitaxel inicial de 1 mM, es decir, 850 µg/ml) del siguiente modo.

[0107] Se preparó la fase oleosa mediante introducción de 190 mg de glicéridos semisintéticos comercializados con la marca Suppocire® NC (Gattefossé) y 138 mg de lecitina de soja (L-α-fosfatidilcolina comercializada por Fluka), fosfatidilcolina al ≤30 %) en un receptáculo adecuado calentado a 50 °C. 17 mg de paclitaxel (comercializado por Sigma-Aldrich) disueltos en 1 ml de cloroformo (es decir, 0,002 mmol de paclitaxel) se agregaron a esta mezcla y después se homogeneizó la mezcla mediante mezcla en vórtex. Después se evaporó el disolvente al vacío a 40-45 °C en un evaporador giratorio mientras se redujo progresivamente la presión.

15

[0108] Se preparó la fase acuosa mediante introducción de 228 mg de Myrj 53 (tensioactivo polietoxilado comercializado por Sigma-Aldrich) en un vial de 2 ml y después se agregó 1,38 ml (1444 mg) de una solución salina ([NaCl] = 154 mM). Se calentó la mezcla a 50 °C para derretir el tensioactivo y después se homogeneizó la solución obtenida mediante mezcla en vórtex. Se mantuvo la solución acuosa a 50 °C.

20

[0109] Se introdujeron la fase oleosa y después la fase acuosa (a 50 °C) en un matraz sumergido en un baño de agua a 50 °C. Después se colocó la solución bifásica en contacto con un sonicador equipado con una sonda cónica (Vibra-cell 75115 comercializada por Bioblock Scientific) mediante la inmersión de aproximadamente 1 cm en la mezcla. Se sonicó ligeramente la mezcla durante 5 minutos con el sonicador ajustado al 25 % de la potencia máxima, con la siguiente secuencia de pulsos: 10 segundos de sonicación/30 segundos de reposo.

25

[0110] Después se filtró la nanoemulsión obtenida a través de un filtro de 0,2 µm para separar el taxol no encapsulado. La concentración de nanopartículas lipídicas en la nanoemulsión obtenida fue de aproximadamente 25 % en peso.

30

[0111] Después, la nanoemulsión quedó lista para uso farmacéutico y se concentró a una cantidad determinada como 612 µg/ml de paclitaxel (es decir, 50 ml de una solución para inyectar para una dosis terapéutica de 30 mg) en un amortiguador de solución salina lista para inyección terapéutica (NaCl 154 mM). La formulación se resume en la tabla 2 abajo.

35

Tabla 2: composición de la formulación del ejemplo 1

	Constituyentes	Peso mg
Fase dispersada	Suppocire NC	190
Fase continua	Solución salina	1444
Tensioactivos	Lecitina	138
	Myrj 53	228
Dopante	Paclitaxel	1,7

Análisis de taxol encapsulado

[0112] Se analizó el paclitaxel encapsulado en la nanoemulsión obtenida mediante HPLC de acuerdo con el procedimiento desarrollado a partir del estudio por S. Kim y col. (S.C. Kim, J. Yu, J. W. Lee, E.-S. Park, S.-C. Chi, Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 2005, 39 170-176).

[0113] En primer lugar, se confirmó el comportamiento fisicoquímico satisfactorio del taxol en las condiciones para preparar la nanoemulsión y para el análisis, verificando la ausencia de la degradación después del sometimiento a ultrasonido, tratamiento con calor (4 h a 60 °C) y en condiciones analíticas (en una mezcla de acetonitrilo/agua).

[0114] El aparato de HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) utilizado fue el siguiente:

50

- Módulo de detección: detector de absorbancia λ doble Waters 2487, detección por UV a 227 nm
- Módulo de separación: Módulo de separación Waters 269

Columna: Supelco fase Supelcosil C18 25034,6 mm, 5 μ m, velocidad de flujo 1 ml/min.
 Volumen inyectado: 20 μ L de solución (1 mg/ml de taxol en metanol, es decir, 1,17 mM).
 Fase móvil: CH₃CN/H₂O.

5

El tiempo de retención del taxol fue $t_R = 14,64$ min para un gradiente de elución que se indica en la tabla 3 abajo:

Tabla 3: Gradiente de elución utilizado

Tiempo (min)	% de H ₂ O	% de ACN
0	66	34
2	66	34
15	30	70
19	66	34
44	66	34

- 10 **[0115]** Para el análisis cuantitativo, se utilizó un estándar interno, 4-dimetilaminobenzoato de etilo (EI) (C₁₁H₁₅NO₂, comercializado por Sigma-Aldrich) que tenía un tiempo de retención de t_R (EI) = 15,256 min en las condiciones descritas arriba. El taxol encapsulado se extrajo de la nanoemulsión mediante ruptura de la emulsión, extrayendo taxol de la mezcla y agregando una cantidad conocida de estándar interno para el análisis por HPLC. Se comparó el resultado obtenido con una curva de calibración preparada anteriormente que representa la proporción entre las áreas A de los picos entre el taxol y el estándar interno.

[0116] Se halló una concentración de taxol de 0,597 mM (concentración teórica de 0,83 mM), y por lo tanto un grado de encapsulado de al menos el 72 %.

20 EJEMPLO 2A

Preparación de una nanoemulsión que encapsula un fotosensibilizador (mTHPP).

- [0117]** Se preparó una nanoemulsión que encapsula 5,10,15,20-tetrakis(4 hidroxifenil)-(21H,23H)-porfirina (mTHPP) comercializado por Sigma-Aldrich del siguiente modo.

- [0118]** Se introdujeron 0,05 g de aceite de soja (Sigma-Aldrich) en un receptáculo adecuado junto con 0,150 g de glicéridos semisintéticos (comercializados con la marca Suppocire® NC (Gattefossé)) y 0,100 g de lecitina de soja (enriquecida con fosfatidilcolina al 75 %, comercializado por Lipoid con la marca Lipoid® S75). Se agregó una cantidad de entre 0,27 mg y 1,37 mg de 5,10,15,20-tetrakis(4 hidroxifenil)-21H,23H-porfirina, (mTHPP comercializado por Sigma-Aldrich) a esta premezcla en solución en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de evaporar el disolvente al vacío, se calentó el residuo a 50-60 °C y se mantuvo la mezcla líquida a esta temperatura para la emulsificación.

- [0119]** En otro receptáculo, se preparó una mezcla de 0,05 g de glicerol, 0,331 g de estearato de polioxietileno que tiene 50 moles de óxido de etileno (comercializado con la marca Myrj® 53 por ICI Americas Inc.) y cloruro de sodio en solución acuosa 154 mM para dar 1,7 g. La solución acuosa obtenida se mantuvo caliente (50-60 °C).

- [0120]** Se introdujeron la fase oleosa y después la fase acuosa, calentadas a 50 °C, en un matraz sumergido en un baño de agua a 50 °C. Después se colocó la solución bifásica en contacto con un sonicador AV505® equipado con una sonda cónica que mide 3 mm de diámetro (Sonics, Newtown) mediante la inmersión de aproximadamente 1 cm en la solución. Después se sonicó la solución durante 5 minutos con el sonicador ajustado al 25 % de la potencia máxima, con la siguiente secuencia de pulsos: 10 segundos de sonicación/30 segundos de reposo. Durante la sonicación, se mantuvo la solución a 50 °C al baño maría.

- [0121]** Se sometió a diálisis la emulsión obtenida contra una solución de cloruro de sodio 154 mM con una membrana de diálisis Spectra/Por® que tiene un umbral de corte igual a 12000 para eliminar los reactivos que no reaccionaron. Después se filtró la emulsión obtenida a través de un filtro de 0,22 μ m para esterilizarla y eliminar toda acumulación y exceso de fotosensibilizador.

[0122] Esta emulsión se puede mantener en el estado en el que se encuentra y después utilizar directamente

después de una posible dilución para aplicación terapéutica sin un tratamiento previo especial tal como la resuspensión.

- [0123]** La tabla 4 a continuación resume la composición de la formulación obtenida antes de la diálisis. El grado medio de incorporación de mTHPP en la nanoemulsión, calculado a partir de la densidad óptica, fue de aproximadamente el 75 % (figura 1).

Tabla 4: composición de la formulación de los ejemplos 2A-2C

Fase dispersada	Constituyentes	Peso mg	% en peso
	Aceite de soja	50	2,5
Fotosensibilizadores	Suppocire®NC	150	7,5
		0,24-2,4	0,012-0,12
	Lecitina	100	5
Tensioactivos	Myrj 53	331	16,55
Fase acuosa	Solución de NaCl, glicerol 154 mM	50	2,5
		1319	65,95
Total		2000	100

- [0124]** Las emulsiones obtenidas de este modo tenían un diámetro promedio de la fase dispersada determinado por difusión de luz (ZeiterSizer Nano, Malvern Instrument) de 29 nm, como se ilustra en la figura 2.

- [0125]** Además, esta formulación de fotosensibilizadores fue muy estable durante al menos 40 días como lo demuestra la estabilidad del diámetro promedio de la fase dispersada en el tiempo que se ilustra en las figuras 2A y 2B.

[0126] Con respecto a todas estas propiedades, la formulación de acuerdo con la invención por lo tanto se puede comercializar en una forma lista para usar.

20 EJEMPLO 2B

Preparación de una nanoemulsión que encapsula un fotosensibilizador (mT20M2P).

- [0127]** Se repitió el ejemplo 2A de forma idéntica, con la excepción de que el fotosensibilizador se reemplazó por una cantidad de 2,3 mg de 5,10,15,20-tetrakis(4 octadeciloximetilfenil)-21H,23H-porfirina (mT20M2P comercializado por Porphyrin systems) directamente en la premezcla.

- [0128]** La tabla 4 anterior resume la composición de la formulación obtenida antes de la diálisis. El grado medio de incorporación de mT20M2P en la nanoemulsión obtenida, calculado a partir de la densidad óptica, fue de aproximadamente el 89 %.

EJEMPLO 2C

Preparación de una nanoemulsión que encapsula un fotosensibilizador (mTPC).

- [0129]** Se repitió el ejemplo 2A de forma idéntica, con la excepción de que el fotosensibilizador se reemplazó por una cantidad de entre 0,24 mg y 2,4 mg de meso-tetrafenilclorina (mTPC comercializado por Porphyrin Systems) agregado en forma de una solución 10 mM en tolueno.

- [0130]** La tabla 4 anterior resume la composición de la formulación obtenida antes de la diálisis. El grado medio de incorporación de mTPC en la nanoemulsión obtenida, calculado a partir de la densidad óptica, fue de aproximadamente el 83 %, figura 1.

Medición del rendimiento cuántico de fluorescencia

- [0131]** Se midió el rendimiento cuántico de fluorescencia de diversos fotosensibilizadores formulados en una nanoemulsión y en el disolvente con referencia al perclorato de Nile Blue en etanol, λ_{exc} 605 nm ($F_{ref} = 0,27$). Los resultados se resumen en la tabla 5. Se halló que los rendimientos fueron sustancialmente aquellos de los fotosensibilizadores en sus respectivos disolventes. Por lo tanto, la formulación en una nanoemulsión no afectó el rendimiento cuántico de fluorescencia de los fotosensibilizadores evaluados.

Tabla 5: rendimiento cuántico de fluorescencia F

Fotosensibilizadores	F
mTHPP en etanol	0,23
mTHPP (nanoemulsión, velocidad de carga 800 μ M)	0,23
mT2OM2P (nanoemulsión, velocidad de carga 660 μ M)	0,16
mTPC en tolueno	0,38
mTPC (nanoemulsión, velocidad de carga 800 μ M)	0,40

EJEMPLO 3

5

Interiorización de las nanoemulsiones en células tumorales

[0132] Se monitorizó la interiorización de las nanoemulsiones que encapsulan mTHPP (velocidad de carga de 600 μ M) obtenida de acuerdo con el ejemplo 2A en células tumorales de la línea U373 *in vitro* mediante microscopía por fluorescencia.

[0133] Se incubaron células tumorales U373, colocadas en cámaras de cultivo sobre portaobjetos (Labtech, Nunc), durante 24 h en una atmósfera controlada que contenía CO₂ al 5 % en presencia de mTHPP formulado en una nanoemulsión de acuerdo con el ejemplo 2 a una concentración final de 2 μ M en el medio de cultivo DMEM (proporcionado por Gibco, Invitrogen). Después de una serie de operaciones de enjuague utilizando DMEM y fijación a 37 °C en una solución de paraformaldehído al 4 %, se colocaron las células en un medio de montaje especial para fluorescencia (Prolong anti-fade, Invitrogen) y se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos.

[0134] La microscopía confocal (Leica TS2) de las muestras mostró fluorescencia en las células tumorales, como se ilustra en la figura 3, lo que demuestra el pasaje de mTHPP formulado en una nanoemulsión desde el exterior de la célula tumoral al interior.

EJEMPLO 4

25 Acumulación pasiva en diversos modelos de tumores

[0135] Se estudió la biodistribución de las nanoemulsiones de acuerdo con la invención en ratones que presentaban tumores utilizando imagenología de fluorescencia no invasiva.

[0136] Para estos requisitos, se prepararon nanoemulsiones de acuerdo con los ejemplos 1 y 2, con la diferencia de que, en lugar del agente terapéutico encapsulado, se utilizó un fluoróforo orgánico lipofílico o anfifílico adaptado para la imagenología de fluorescencia no invasiva *in vivo* (fluoróforo DiD o DiR, Invitrogen y ICG Sigma), como se describe en la solicitud de patente PCT FR2007/000269.

[0137] Las células que actuaron como modelo de tumor eran células Ts/Apc que provenían de un cáncer de mama murino (Ts/Apc) (Lollini, P.L.; Degiovanni, C.; Landuzzi, L.; Nicoletti, G.; Frabetti, F.; Cavallo F.; Giovarelli, M.; Forni, G.; Modica, A.; Modesti, A.; Musiani, P.; Nanni, P.; Human Gene Therapy 1995, 6, (6), 743-752). Se cultivaron las células Ts/Apc en un medio de cultivo RPMI 1640 que comprendía FCS al 10 %, 50 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomycin, 2-mercaptoetanol a $2,5 \times 10^{-5}$ M (comercializado por Sigma-Aldrich). Se mantuvieron las células a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. Se inyectaron 10^6 células por vía subcutánea en el lomo de ratones hembra lampiños de 5-6 semanas (IFFA-Credo, Marcy l'Etoile, Francia) 2 semanas antes de la inyección con las nanoemulsiones. Todas las inyecciones y adquisiciones de imágenes se realizaron mientras los ratones se mantenían bajo anestesia general mediante un gas (isoflurano). Se obtuvieron imágenes de los animales anestesiados con dispositivos de imagenología por reflectancia de fluorescencia (FRI) adaptados a las propiedades espectrales de los fluoróforos encapsulados.

[0138] La figura 4 muestra la señal de fluorescencia obtenida 24 h después de la inyección. La imagen muestra claramente la acumulación del trazador fluorescente en el tumor, para los dos fluoróforos diferentes.

50 EJEMPLO 5

Preparación de nanoemulsiones funcionalizadas

[0139] Las nanoemulsiones se pueden funcionalizar utilizando tensioactivos funcionalizables para aumentar su acumulación en el tumor por un fenómeno de direccionamiento activo.

5 **[0140]** Como ejemplo, se funcionalizó una nanoemulsión que encapsula DiD preparada de acuerdo con el ejemplo 4 mediante un ciclopéptido (cRGD) capaz de fijarse en los receptores membranosos, las $\alpha_v\beta_3$ integrinas. Estas integrinas se sobreexpresaron durante el fenómeno de angiogénesis, a saber la creación de nuevos vasos sanguíneos que acompaña especialmente la mayoría de los crecimientos tumorales.

10 **[0141]** La funcionalización se puede realizar antes o después de la emulsificación. A continuación se proporciona una explicación sobre cómo proceder para funcionalizar un cotensioactivo antes de la emulsificación.

Preparación de un péptido de direccionamiento funcionalizado por un cotensioactivo de injerto

15 **[0142]** Un péptido cíclico de direccionamiento de las $\alpha_v\beta_3$ integrinas sobreexpresado en la superficie de células endoteliales, c(RGCf[ϵ -S-acetiltioacetilK comercializado por Ansynt Service BV (Países Bajos) y denominado en lo sucesivo cRGD que posee un grupo tiol protegido en forma de un ácido mercaptoacético, se acopló con un cotensioactivo de injerto, diestearoilfosfatidietanolamina poli(etilenglicol) 5000-maleimida (DSPE-PEG(5000)-maleimida comercializado por Avanti Polar Lipids Inc), en donde este último se mezcla con cRGD en una
20 proporción molar de 1:1 en una solución de amortiguador de ácido sulfónico de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano/etilendiaminatetraacético (HEPES/EDTA) con una concentración de hidroxilamina de 0,05 M. Se agitó lentamente la solución bajo un flujo suave de argón a temperatura ambiente durante 4 horas, se evaporó a presión baja y después se redisolvió en cloroformo antes de la segunda etapa.

25 **[0143]** La nanoemulsión funcionalizada después se preparó siguiendo el protocolo indicado en el ejemplo 2, con la diferencia de que se reemplazó el 2 % en peso de aceite por la cantidad equivalente de péptido preparada como se indicó arriba.

[0144] Se inyectaron una solución de nanoemulsión cubierta con DiD funcionalizada por cRGD y, como
30 comparación, una nanoemulsión cubierta con DiD no funcionalizada en ratones que poseían un tumor que provenía de células Hek β_3 . Estas células tumorales se implantaron en el lomo de ratones hembra lampiños siguiendo un protocolo similar al descrito arriba.

[0145] Una comparación del desarrollo de la proporción del tumor en la piel de los ratones tratados por una
35 nanoemulsión funcionalizada por cRGD con aquellos que recibieron una nanoemulsión no funcionalizada demostró una acumulación preferida de las nanopartículas funcionalizadas por cRGD en el tumor. Demostró direccionamiento activo para la vectorización de las moléculas en cuestión.

[0146] Por lo tanto, la nanoemulsión de acuerdo con la invención constituye una formulación de agentes
40 terapéuticos capaz de permitir una administración más dirigida, que por ende contribuye con una reducción de la dosis administrada y, por este motivo, la duración y los efectos secundarios no deseados del tratamiento.

[0147] Además, se descubrió que la carga de agente terapéutico apenas modificó las propiedades de las nanoemulsiones preparadas en cuanto al tamaño de la fase dispersada, la naturaleza de la interfaz y su carga, los
45 principales factores que actúan en su biodistribución *in vivo*. Por último, las nanoemulsiones que encapsulan ingredientes activos, tales como paclitaxel o fotosensibilizadores, se acumulan de forma pasiva en los tumores, y es posible que esta acumulación se refuerce mediante direccionamiento activo por injerto de un ligando biológico tal como, por ejemplo, cRGD.

50 **[0148]** Las nanoemulsiones proporcionadas de acuerdo con la invención por lo tanto constituyen una forma eficaz de vectorización, de forma pasiva o activa, de agentes terapéuticos hacia tumores y por lo tanto constituye una herramienta valiosa para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, especialmente por vía de quimioterapia o fototerapia.

55 EJEMPLO 6

Observación de la estabilidad de la nanoemulsión

[0149] Los experimentos que siguen se realizaron para demostrar la estabilidad conferida a las

nanoemulsiones por el lípido solubilizante.

EJEMPLO 6A: observación de la viscosidad interna alta de las gotas mediante NMR

- 5 **[0150]** Se preparó una nanoemulsión que comprende 255 mg de Suppocire® NC (Gattefossé) (lípido solubilizante), 85 mg de aceite de soja (Sigma Aldrich) (aceite), 345 mg de Myrj52® (ICI Americas Inc) (cotensioactivo), 65 mg de Lipoid® s75 (lecitina, lípido anfifílico) y un amortiguador de fosfato (PBS) de acuerdo con el protocolo del ejemplo 1.
- 10 **[0151]** Se analizó la nanoemulsión a 10 °C y a 60 °C por resonancia magnética nuclear del protón. Los picos asociados con los componentes centrales de las gotas de la nanoemulsión (aceite/lípido solubilizante y lípido anfifílico) (0,9; 1,5; 1,6; 2,0; 2,2; 4,1; 4,2 ppm) observados dentro de los espectros de ¹H NMR se ampliaron en comparación con la referencia (0 ppm ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico (DSS)), especialmente cuando la temperatura era baja, lo que destaca la viscosidad interna alta de las gotas. Los picos asociados con el
- 15 cotensioactivo Myrj53® (3,7 ppm) no mostraron aumento, lo que indica que el cotensioactivo permaneció en la superficie de las gotas, las cadenas de polioxietileno se solubilizaron en el amortiguador acuoso (figura 7).

EJEMPLO 6B: observación de la ausencia de cristalización en las gotas mediante calorimetría de barrido diferencial

- 20 **[0152]** Se preparó una nanoemulsión que comprende 150 mg de Suppocire® NC (Gattefossé) (lípido solubilizante), 50 mg de aceite de soja (Sigma Aldrich) (aceite), 228 mg de Myrj53® (ICI Americas Inc) (cotensioactivo), 100 mg de Lipoid® s75 (lecitina, lípido anfifílico) y un amortiguador de fosfato (PBS) de acuerdo con el protocolo del ejemplo 1.
- 25 **[0153]** Los termogramas obtenidos mediante análisis de calorimetría de barrido diferencial de la nanoemulsión después de la preparación y después de 4 meses de almacenamiento a temperatura ambiente muestran que no se observó pico de fusión después de la producción, ni después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 4 meses, lo que indica que las gotas no se cristalizaron (figura 8).

30 EJEMPLO 6C: demostración de la influencia de la composición de nanoemulsiones sobre la estabilidad física

- [0154]** Se prepararon tres nanoemulsiones que comprenden 228 mg de Myrj53® (ICI Americas Inc) (cotensioactivo), 100 mg de Lipoid® s75 (lecitina, lípido anfifílico), 1600 µL de amortiguador de fosfato (PBS), Suppocire® NC (Gattefossé) (lípido solubilizante) y aceite de soja (Sigma Aldrich) (aceite) en las cantidades
- 35 indicadas en la tabla 6 de acuerdo con el protocolo del ejemplo 1.

Tabla 6: cantidades de Suppocire® NC y aceite de soja en las nanoemulsiones

Nanoemulsión	NC0	NC50	NC100
Suppocire® NC	0	100 mg	200 mg
Aceite de soja	200 mg	100 mg	0

- [0155]** Se realizó una prueba de estabilidad acelerada a 40 °C en las tres nanoemulsiones obtenidas. La
- 40 monitorización del tamaño/polidispersidad de las nanoemulsiones en el tiempo permitió destacar el efecto estabilizante del lípido solubilizante. Mientras que el tamaño de las nanoemulsiones que no contenían lípido solubilizante aumentó considerablemente después de casi 170 días a 40 °C, las nanoemulsiones que contenían lípido solubilizante no presentaron un cambio significativo en el tamaño de la gota (figura 9). Los resultados muestran que el agregado de lípido solubilizante a la composición de las nanoemulsiones confiere mayor estabilidad
- 45 física a las gotas y a la nanoemulsión.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación fotosensibilizadora en forma de una nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase oleosa dispersada, en la que la superficie de la fase dispersada tiene un potencial zeta cuyo valor absoluto es inferior a 20 mV,
5 en la que la fase acuosa comprende al menos un cotensioactivo polialcoxilado y en la que la fase oleosa comprende, además del fotosensibilizador, al menos un lípido anfifílico y al menos un lípido solubilizante que consiste en una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden:
10
 - entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos de C8,
 - entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos de C10,
 - entre el 10 % y el 70 % en peso de ácidos grasos de C12,
 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C14,
 - 15 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C16 y
 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C18.
2. Una formulación fotosensibilizadora de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el lípido anfifílico es un fosfolípido.
20
3. Una formulación fotosensibilizadora de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la fase oleosa además comprende al menos un aceite.
4. Una formulación fotosensibilizadora de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el aceite tiene un equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de entre 3 y 6.
25
5. Una formulación fotosensibilizadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el cotensioactivo comprende al menos una cadena compuesta por unidades de óxido de etileno o unidades de óxido de etileno y óxido de propileno.
30
6. Una formulación fotosensibilizadora de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el cotensioactivo se selecciona de los compuestos conjugados polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE), éteres de ácido graso y polietilenglicol y ésteres de ácido graso y polietilenglicol, y copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno.
35
7. Una formulación fotosensibilizadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizada porque** está funcionalizada.
8. Un procedimiento para preparar una formulación fotosensibilizadora en forma de una nanoemulsión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y que comprende al menos una fase acuosa continua y al menos una fase oleosa dispersada, que comprende las etapas de:
40
 - (i) preparar la fase oleosa que comprende el fotosensibilizador, un lípido anfifílico y al menos un lípido solubilizante que consiste en una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden:
45
 - entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos de C8,
 - entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos de C10,
 - entre el 10 % y el 70 % en peso de ácidos grasos de C12,
 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C14,
 - 50 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C16 y
 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos de C18.
 - (ii) preparar una fase acuosa que comprende un cotensioactivo polialcoxilado;
 - (iii) dispersar la fase oleosa en la fase acuosa bajo el efecto de una fuerza de corte suficiente para formar una nanoemulsión; y
 - 55 (iv) recuperar la nanoemulsión así formada.
9. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el efecto de la fuerza de corte se produce mediante sonicación.

10. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que la fase oleosa se prepara colocando todos o algunos de los constituyentes en solución en un disolvente adecuado y evaporando posteriormente el disolvente.

5

11. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la administración de un fotosensibilizador a seres humanos o animales para tratar una enfermedad o dolencia.

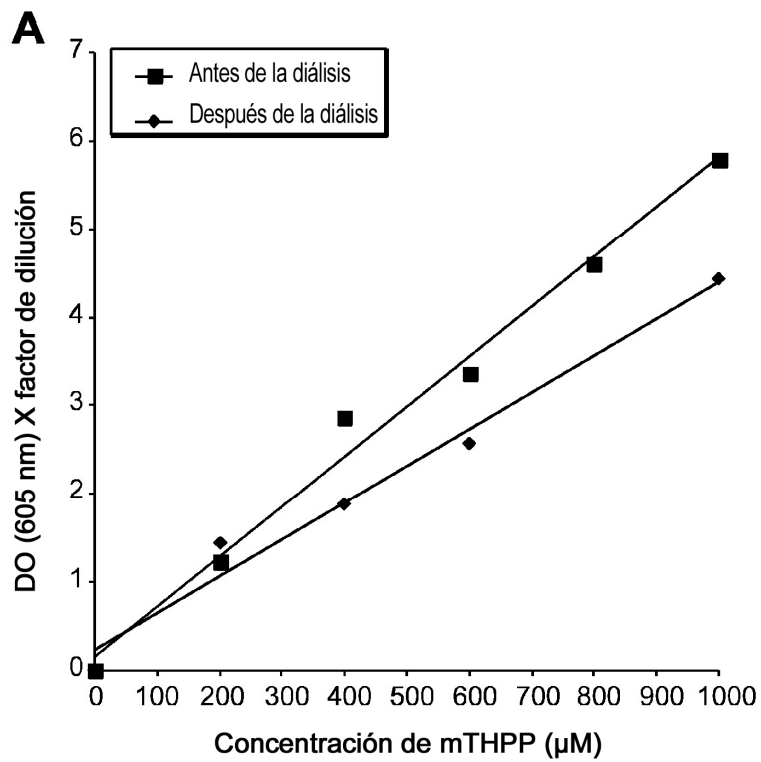
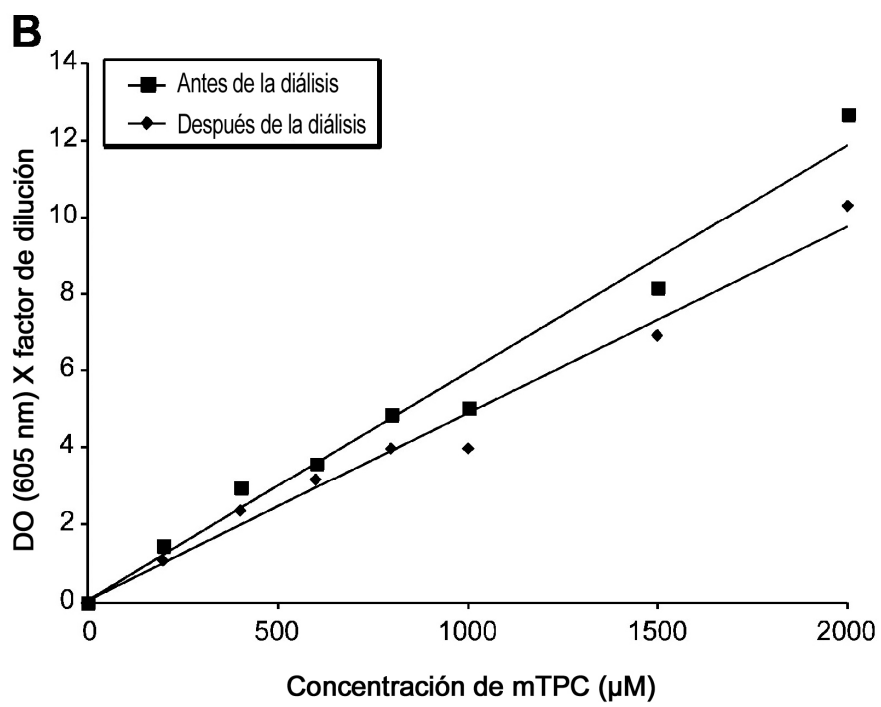


FIG.1



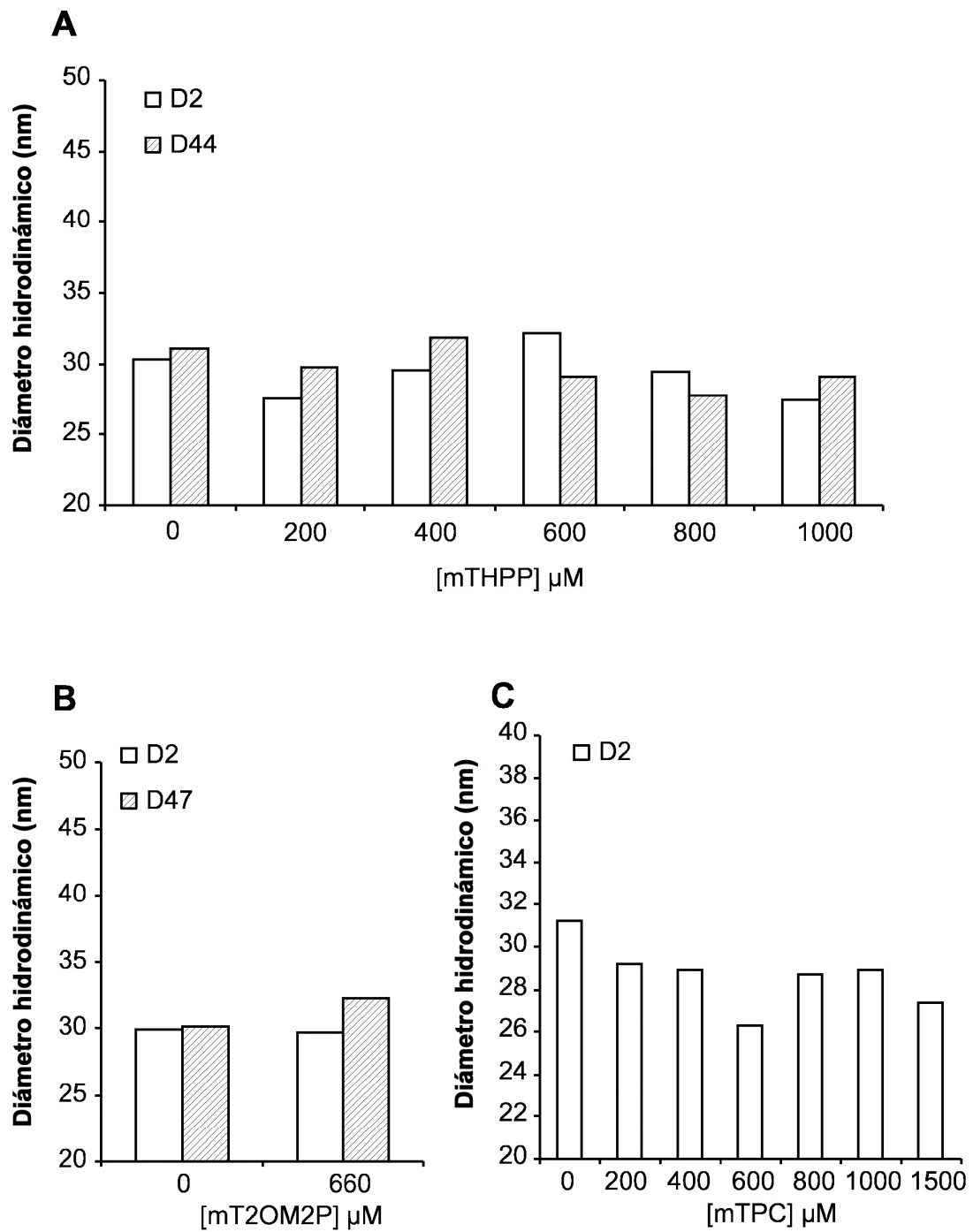


FIG.2

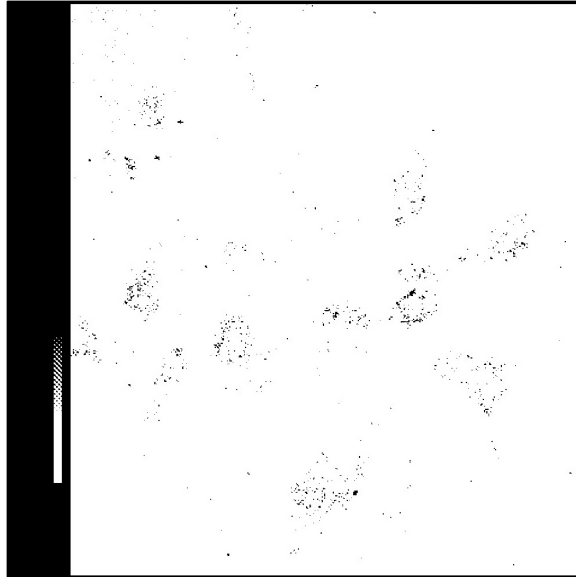


FIG.3

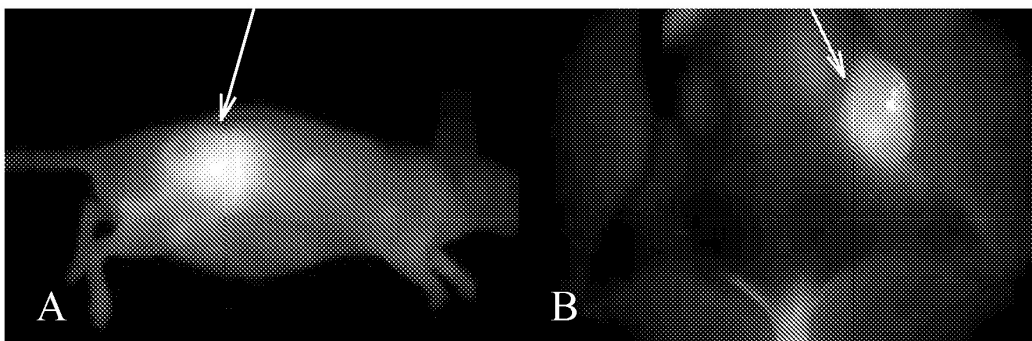


FIG.4

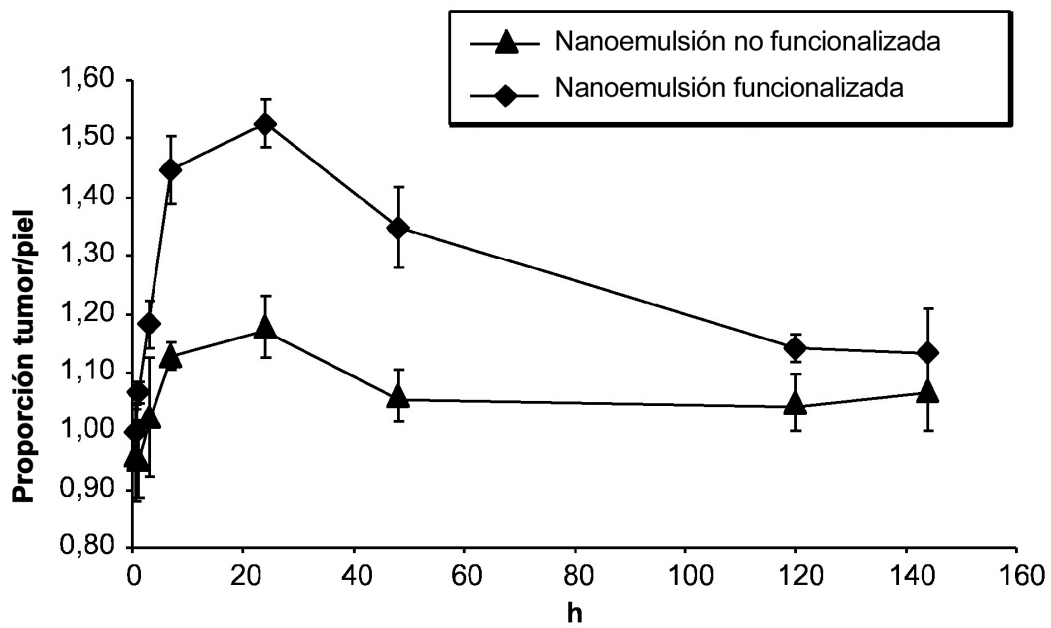


FIG.5

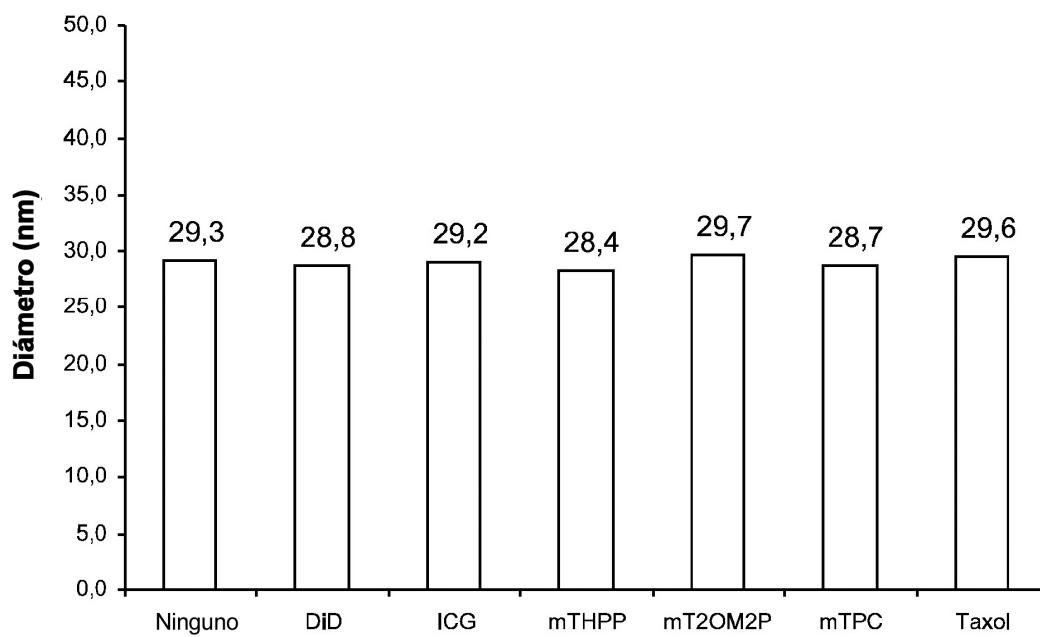


FIG.6

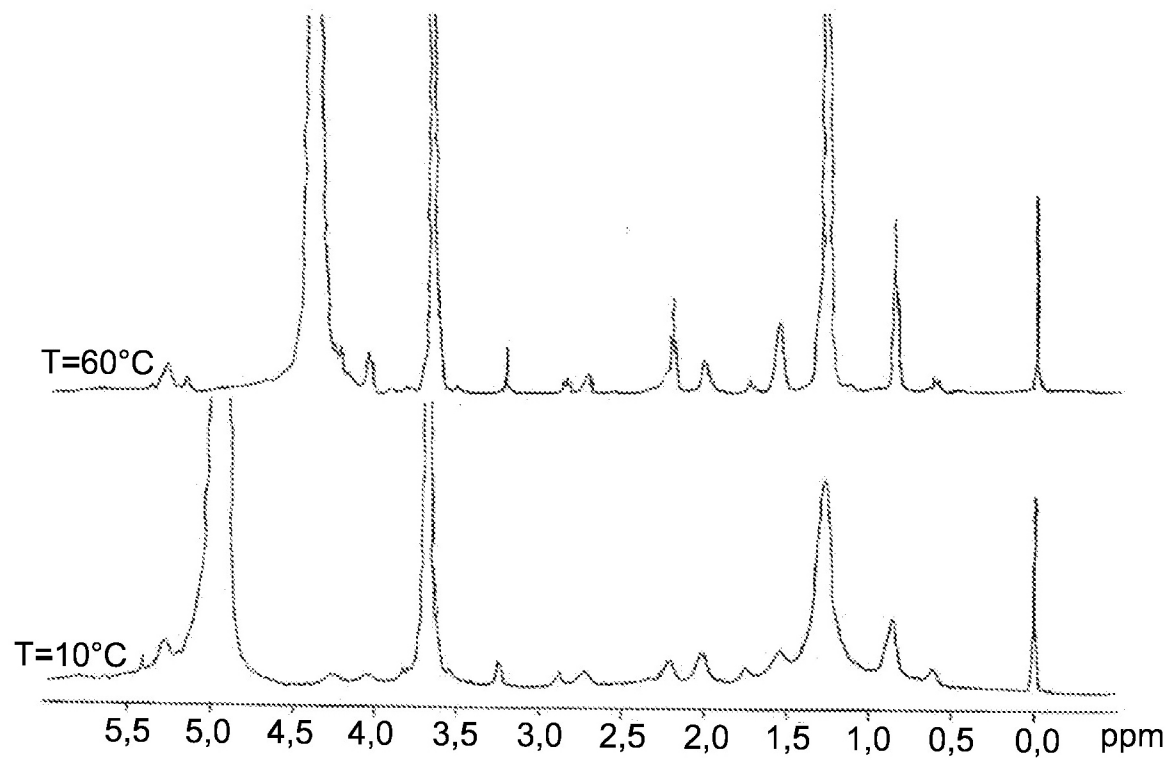
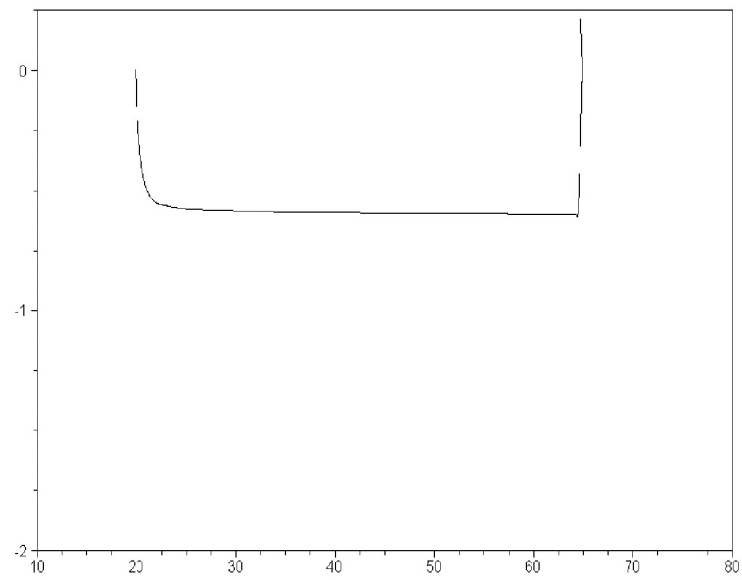


FIG.7

A



B

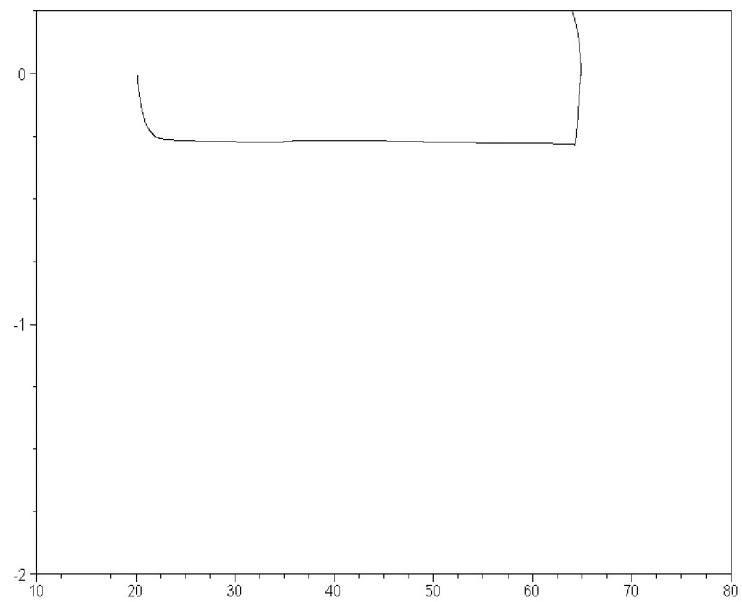


FIG.8

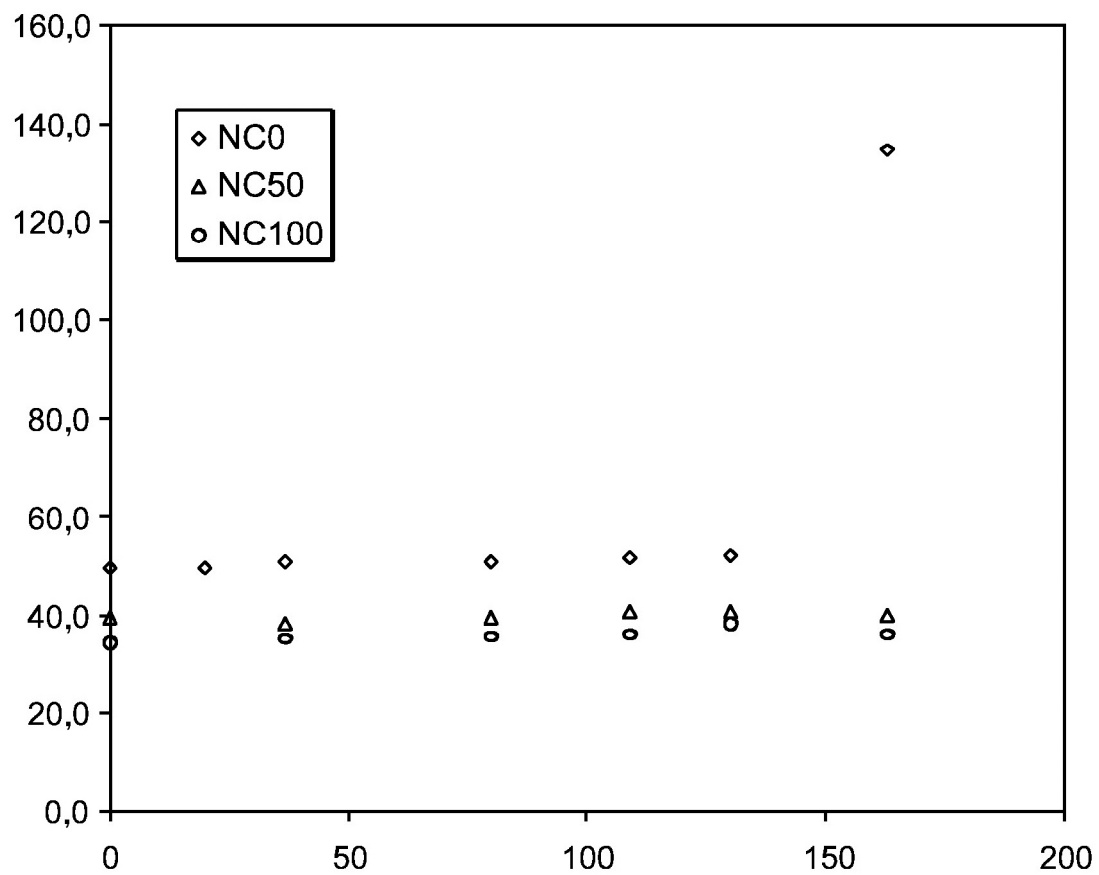


FIG.9