



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 684**

51 Int. Cl.:  
**B01J 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01122184 .3**

86 Fecha de presentación : **17.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1293248**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54

Título: **Nuevo sistema coloidal dispersable a base de calixareno en forma de nanopartículas.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73

Titular/es: **NanoPart-C S.A.**  
**avenue Cardinal-Mermillod 36**  
**1227 Carouge, CH**

72

Inventor/es: **Goreloff, Philippe Jean-Bois y**  
**Colemann, Anthony William**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 306 684 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

Nuevo sistema coloidal dispersable a base de calixareno en forma de nanopartículas.

5 **Campo del invento**

El presente invento se refiere a un nuevo sistema coloidal dispersable en agua a base de calixareno anfifílico en forma de partículas de tipo de matriz generalmente esférica y de tamaños típicamente en la gama de 50 a 500 nm. Estas partículas son llamadas a continuación "nanoesferas sólidas" y son capaces de encapsular y transportar una o más moléculas activas. Se preparan generalmente bajo fuerzas iónicas variables de sales, y a pH y temperaturas variables. El invento se refiere además a procedimientos para la preparación de este sistema.

**Antecedentes del invento**

15 Es ya bien conocido por el experto en el arte que moléculas relativamente pequeñas pueden ser captadas por moléculas mayores las cuales pueden ser monoméricas o poliméricas, con una cavidad intramolecular o intermolecular. El tamaño de estas combinaciones de por lo menos dos moléculas diferentes, conteniendo las moléculas huéspedes moléculas anfitrión, está en la gama de submicras como se ha indicado antes, o sea entre 50 y 500 nanómetros.

20 Partículas submicrónicas se describen, por ejemplo en las patentes siguientes: BE-A-808.034, BE-A-839.748, BE-A-869.107, FR-A-2.504.408, EP-A-0.275.796, EP-A-0.349.428, US-A-5.718.905, WO 93/25.194 y FR-A-2.681.868.

25 Las patentes belgas n° 808.034 y 839.748 describen partículas submicrónicas formadas por polimerización de monómeros incluyendo derivados de ácido acrílico o metacrílico. La polimerización micelar y/o interfacial de varios monómeros genera partículas de tamaño bajo la escala micrónica. Estos sistemas pueden encapsular sustancias activas. Las partículas forman suspensiones coloidales acuosas estables que permiten que estas partículas comporten moléculas biológicamente activas para administración médica. Sin embargo, el alto grado de estabilidad y la carencia de una vía apropiada para eliminación biológica de los ácidos poliméricos da lugar a un serio inconveniente en su uso, por cuanto son retenidos dentro del tejido corporal o dentro de las cavidades corporales conduciendo a posibles reacciones secundarias.

30 Este inconveniente se supera parcialmente de conformidad con la patente BE-A-869.107 en donde se citan nanopartículas biodegradables conteniendo una molécula biológicamente activa. Los inconvenientes principales de estos sistemas surgen de la toxicidad de productos de degradación bajo condiciones fisiológicas así como la metodología de la encapsulación de sustratos activos. Bajo el procedimiento descrito una red de polímero altamente densa es la base de la formación de las partículas. La adsorción superficial de las moléculas se utiliza en el transporte y por tanto los niveles de incorporación son bajos. Surgen problemas secundarios del control de la reacción de polimerización, que pueden dejar monómeros solubles u oligómeros cortos solubles, y estos compuestos pueden lixivarse subsiguientemente de la matriz. Los procesos de purificación utilizados son de alto consumo de tiempo y costosos.

35 Se han utilizado proteínas, tal como albúmina, para la preparación de nanosistemas mediante desnaturado térmico (Kramer, P.A.J., *Pharm. Sci.*, 63, 1646, 1974) o mediante desnaturalización con sal o disolvente de proteínas tal como gelatina en solución (Martey et al., *Aust. J. Pharm. Sci.*, 6, 65, 1978 o *Pharm. Acta Helv.*, 1, 53, 1978). La dispersión de proteína desnaturalizada se reticula subsiguientemente. En el primer caso la necesidad de pre-dispersar la proteína en una emulsión de aceite-agua requiere el uso de tensoactivos secundarios y también sonicación. En el segundo caso deben eliminarse grandes cantidades de material inorgánico antes del uso. En ambos sistemas debe eliminarse aldehído en exceso tóxico.

40 La EP-A-0.275.796 y EP-A-0.349.428 describe nanopartículas que se preparan con métodos de difusión de disolvente a partir de dosis sistemas no miscibles. Sin embargo los nanosistemas a base de proteína descritos en la EP-A-0.349.428 requieren el uso de condiciones altamente específicas, limitando su aplicación.

45 La patente francesa FR-A-2.551.072 describe cápsulas micrométricas como una forma de sistema farmacéutico de liberación mantenida, que se preparan a partir de polioli ésteres. Sin embargo estas micropartículas no son apropiadas para administración intravascular sin implicar riesgo médico.

50 Varias patentes, tal como US-A-5.718.905, WO 93/25194 y FR-A-2.681.868 describen el uso de ciclodextrinas modificadas como material de base para las nanoesferas. Estas tienen la ventaja de ser biodegradables, su administración está seguida de liberación de la molécula activa, y es posible obtener biodegradabilidad, que se controla apropiadamente haciendo uso de ciclodextrinas modificadas que difieren entre sí por la naturaleza de los grupos sustituyentes utilizados. Estas ciclodextrinas modificadas y su preparación se describe especialmente por Pin Zhang, C.C. Ling, A.W. Coleman, Parrot-Lopez y H. Galons en *Tetrahedron Letters* 32, N° 24, 2679-70, 1991.

55 Sin embargo todos los nanosistemas a base de ciclodextrina comparten una serie de problemas, en primer lugar alto costo de síntesis y producción ya que las modificaciones iniciales requieren todas un secado por vacío de las ciclodextrinas a 120°C; en segundo lugar el empleo de material reactivo tóxico, incluyendo piridina, yodo, azida sódica, aminas secundarias que puede permanecer atrapado en las cavidades moleculares; en tercer lugar la bio-degradación

puede liberar la ciclodextrina pariente que se sabe es altamente hemolítico. No se ha presentado evidencia de que esta actividad hemolítica esté ausente en las especies modificadas.

### Sumario del invento

5

El invento tiene por objeto eliminar todos estos problemas y proporcionar una nueva clase de nanosistemas del tipo antes expuesto que son completamente compatibles con el uso médico, biológico, veterinario, cosmético y alimentario, que son de fabricación fácil y relativamente económica a partir de compuestos no tóxicos, lo cual no implica compuestos tóxicos o incompatibles durante la fabricación, y que no darán materia tóxica o aún incompatible durante la biodegradación.

10

Las nanopartículas de conformidad con el presente invento comprenden calixarenos anfífilicamente modificados como las moléculas incluyentes. Las nuevas composiciones del invento comprenden un sistema coloidal dispersable constituido por dichas nanopartículas como un vehículo y de por lo menos un compuesto activo que ha de ser portado.

15

Los calixarenos son compuestos policíclicos que son conocidos desde los 1970. Una revisión de esta clase de compuestos químicos puede encontrarse, por ejemplo, en C.D. Gutsche, "Topics in Current Chemistry", Vol. 123, Springer 1984, p. 1 a 47; y C.D. Gutsche. "The calixarenes revisited", *Chem. Soc.* 1998. Los calixarenos se obtienen generalmente de un fenol para sustituido y un aldehído, típicamente formaldehído, y mediante ciclización de los oligómeros lineales que se forman primariamente. Estos son compuestos extremadamente estables y ya se han propuesto como materiales de confinamiento para desechos altamente tóxicos debido a su inertidad, insolubilidad y estabilidad térmica.

20

El invento proporciona además un procedimiento para la preparación de la nueva composición a base de calixareno. Este procedimiento comprende las etapas de (1) proporcionar por lo menos un calixareno sustituido anfífilico, (2) proporcionar una fase líquida constituida esencialmente por una solución de dicho calixareno anfífilico en un disolvente orgánico, (3) proporcionar una segunda fase líquida constituida por agua o una mezcla acuosa o solución iónica, (4) combinar dichas dos fases líquidas de los pasos (2) y (3) y (5) recuperar una suspensión coloidal de nanoesferas conteniendo dicho calixareno anfífilicamente sustituido.

25

30

Se prefiere utilizar en la etapa (2) un disolvente orgánico seleccionado de compuestos que contienen oxígeno tal como alcoholes, cetonas, aldehídos, éteres y sus mezclas. El disolvente puede ser una mezcla de dos o más disolventes y puede contener también agua.

35

La combinación de las dos fases como para el paso 4) se conduce de preferencia bajo moderada agitación al verter una de las dos fases en la otra.

El material activo que ha de combinarse con las nanoesferas está contenido en por lo menos una de las fases líquidas descrita en los pasos (2) y (3) anteriores, pero de preferencia solo en una de las dos fases (2) o (3). Este material activo puede seleccionarse de por lo menos uno de los materiales y sustancias siguientes, dados a título de ejemplo como un listado no exhaustivo, y perteneciente a los grupos siguientes:

40

A) Sustancias cosméticas: aceites ungüentos, anti-oxidantes, colorantes, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas, sales, tensoactivos, compuestos hidratantes, emulgentes, geles, jabones, aceites esenciales, perfumes, agentes deshidratantes o desecantes, por ejemplo.

45

B) Alimentos y bebidas: aceites, anti-oxidantes, colorantes, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas, sales, tensoactivos, compuestos hidratantes, emulgentes, geles, agentes saborizantes, aceites esenciales, agentes olfactivos, azúcares, lípidos, agentes edulcorantes, estabilizantes, modificadores del sabor o sustancias volátiles, por ejemplo.

50

C) Productos fitosanitarios: fertilizantes, insecticidas, pesticidas o acaricidas, por ejemplo, y

D) Productos farmacéuticos: medicinas, medicaciones, agentes formadores de imagen, colorantes, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas, sales, ácidos nucleicos y ADN, carbohidratos, lípidos y fosfolípidos, por ejemplo.

55

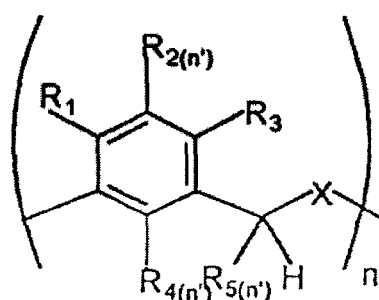
Ambas fases (2) y (3) pueden contener agentes auxiliares tales como tensoactivos, cotensoactivos, estabilizantes, agentes dispersantes o colorantes, por ejemplo.

60

Las nanopartículas se recuperan como suspensión coloidal que se forma debido a que los calixarenos sustituidos, disueltos en la fase orgánica (2), son virtualmente insolubles en la fase acuosa (3). Por consiguiente, cuando se preparan dichas dos fases, debe tenerse cuidado, evidentemente, de que los disolventes utilizados se seleccionen en respuesta a la solubilidad e insolubilidad, respectivamente, del calixareno sustituido que se utiliza. Estas consideraciones no cabe decir que son familiares para el experto en el arte.

65

Los calixarenos sustituidos que se utilizan de preferencia en la práctica del presente invento se describen por la fórmula general



Formula 1

en donde:

$R_1 =$  H, OH, OR u OCOR;

$R_2 =$  H, R, COR,  $CH_2$ Pol, Y o  $CH_2$ Y;

$R_3 =$  H, OH, OR u OCOR;

$R_4 =$  H, OR,  $OCH_2$ R, OCOR o un éster, ácido carboxílico, amido, amino, péptido o grupo carbohidrato;

$R_5 =$  R o Y;

R = una cadena hidrocarbúrica lineal o ramificada saturada o insaturada que puede estar sustituida por halógeno y/o por un grupo Pol; o R es un radical hidrocarbúrico cíclico, saturado o no;

Pol = un grupo polar elegido entre ácido fosfórico, ácido sulfúrico, amino, amonio, ácido carboxílico y sus sales;

Y = halógeno o pseudo-halógeno;

X = un enlace directo, O, S o  $NR_6R_7$ ;

$R_6 =$  alquilo, acilo o hidrógeno;

$R_7 =$  alquilo, acilo o hidrógeno;

n = un número entero de 3 a 20; y

$n' =$  un número entero  $\leq n$ ;

el compuesto de la fórmula anterior conteniendo por lo menos un grupo Pol.

Los compuestos de fórmula I pueden prepararse, a partir de calixarenos bien conocidos, de conformidad con el método descrito por P. Shahgaldian, A.W. Coleman y V.I. Kalchenko en *Tetrahedron Letters* 42 (2001), 577-579.

La característica general de estas moléculas es que una función hidrofóbica, generalmente una cadena de acilo o alquilo, se une en el oxígeno fenólico o en el átomo de carbono situado en la posición para respecto de la función hidroxilo, si bien estos grupos hidrofóbicos pueden aplicarse también sobre el sustituyente de puenteo (que comporta el radical  $R_5$ ), y que una función hidrofílica apropiada, o sea una o más de las funciones polares citadas en la fórmula 1, está unida en la función opuesta a la modificada por la función hidrofóbica. El calix[n]areno puede contener de 4 a 20 grupos fenólicos. La función puente puede ser un simple grupo de metileno, un grupo oxometileno, un átomo puente tal como O, S,  $NR_5R_6$ , etc; o puede estar adicionalmente ramificada. El invento permite extender el posible esqueleto de calix[n]areno a los calixresorcinarrenos conocidos, sistemas basados en ácido cromotrópico y estructuras heterocíclicas que tienen la misma estructura esquelética que los calix[n]arenos. Ejemplos específicos de estas moléculas se describen en la publicación de Felix *et al.* (*Tetrahedron Letters* 1998 vol 39, 9171); y Shahgaldian *et al.*, ya citado antes.

La encapsulación óptima de una molécula adicionada se obtiene mediante disolución en la fase en la que es soluble. Las moléculas activas utilizadas aquí son aquellas que tienen aplicaciones cosméticas conocidas o potenciales, incluyendo no exhaustivamente colorantes, vitaminas, aceites esenciales, provitaminas, péptidos, mono o polisacáridos, proteínas u hormonas, por ejemplo.

## ES 2 306 684 T3

La elección del sistema disolvente utilizado en 1) puede incluir alcoholes tal como metanol, etanol, propanoles o butanoles, por ejemplo, cetonas tal como dimetilcetona, etilmetilcetona o dietilcetona, por ejemplo, aldehidos tal como acetaldehido, propionaldehidos (ramificados o no), butiraldehidos (ramificados o no) por ejemplo, éteres tal como éter dimetilico, etil metil éter, dietil éter o tetrahidrofurano, por ejemplo. La elección del sistema acuoso en la fase (3) puede incluir agua pura, soluciones iónicas en agua, soluciones ácidas o básicas, soluciones de solutos polares incluyendo carbohidratos, alcoholes o aminoácidos, por ejemplo. Todas estas soluciones pueden contener o no moléculas que tienen aplicaciones cosméticas conocidas potenciales incluyendo vitaminas, pro-vitaminas, péptidos, aminoácidos, moléculas antioxidantes, colorantes o componentes aromáticos, por ejemplo.

El procedimiento del invento puede llevarse a cabo a varias temperaturas (que tienen poca influencia sobre su progreso), especialmente entre 0°C y la temperatura de ebullición de los disolventes. La relación volumétrica entre la fase (2) y la fase (3) puede oscilar, de preferencia, entre 0,1 y 1.

Cuando se considere útil puede utilizarse uno o mas co-tensoactivos en la preparación de las nanoesferas de matriz, pudiendo incluir estos tensoactivos iónicos tal como ácidos carboxílicos, alquilfosfonatos, alquilsulfonatos, alquilaminas, tensoactivos no iónicos tal como ácido plurónico, Tween, etc.; su proporción puede variar entre 0,01% y 10%. El uso de estos cotensoactivos tiene efecto esencialmente cero sobre la estabilidad temporal pero puede permitir variar el tamaño de la nanoesfera de matriz.

El tamaño de las nanoesferas de matriz-base de este invento puede variar mediante la selección de la velocidad de adición de la fase (2) a la fase (3) o viceversa, de las concentraciones de materia sólida en las dos fases, y también mediante la modificación de la naturaleza y/o concentración del calix[n]areno y el disolvente utilizado. Se ha encontrado también que en algunos casos la temperatura de las dos fases tiene una influencia sobre el tamaño de las nanoesferas que se obtienen. La agitación de la solución madre requiere una agitación que sea suficiente para homogenizar la mezcla de la fase (2) y (3) y se obtiene mejor mediante agitación mecánica, por ejemplo utilizando una varilla magnética a 50-500 rev/min. La agitación no es esencial para la preparación de pequeñas cantidades de nanoesferas.

El tensoactivo antes citado puede estar presente especialmente en una proporción de 0,1 a 10%, de preferencia de 0,2 a 10% en peso de la suspensión coloidal obtenida en la etapa (4). La suspensión coloidal de nanoesferas puede concentrarse, esterilizarse, tamponarse (por ejemplo a pH fisiológico), centrifugarse, dializarse y liofilizarse según se requiera. Para las nanoesferas de este invento la preparación tiene la ventaja de ser reversible. El sistema coloidal puede recrearse mediante simple tratamiento con una solución acuosa.

Una ventaja principal y totalmente inesperada del presente invento es la elevada estabilidad temporal de las nanoesferas de matriz. Estas conservan su tamaño original y todas sus otras propiedades físicas durante periodos de mas de 1 año aún cuando se mantengan a 4°, 20° y 40°C.

Las nanoesferas aquí descritas puede representarse mediante microscopia de alta resolución (ya sea microscopia SEM/TEM o microscopia de fuerza atómica). El empleo de este modo para representar con imagen el sistema demuestra claramente la alta estabilidad mecánica del sistema. Esto puede compararse con la exigencia de formación de imagen AFM de modo sin contacto para visualizar nanoesferas coloidales a base de ciclodextrina. (Sommer *et al.*, *Supramol. Chem.*, 1993, vol 3, 19). Las nanoesferas producidas pueden variar en tamaño de 50 a 500 nm con un tamaño general entre 90 y 200 nm. Estas variaciones de tamaño se obtienen con las técnicas antes citadas.

Puede obtenerse factores de carga de moléculas incorporadas de altos a muy altos utilizando las nanoesferas a base de calix[n]areno, por ejemplo factores de carga de 1 a 25% pueden obtenerse fácilmente. La carga de esta índole en la matriz permite: a) transporte de moléculas insolubles en sistemas acuosos, b) protección de estas moléculas frente a la degradación por procesos químicos o biológicos, c) modificación de las cinéticas de transporte y disponibilidad de moléculas incorporadas en aplicaciones cosméticas.

La prueba ha mostrado la no aparente citotoxicidad de efectos hemolíticos de las nanoesferas a base de calix[n]areno y los derivados aquí citados en el nivel celular. (Perret, F., Shahgaldian, P. *et al.*, *International Symposium on Supramolecular Chemistry*, Fukuoka, 2000).

Las nanoesferas de este invento pueden contener una o varias moléculas activas dentro de su matriz, por ejemplo retinal,  $\beta$ -caroteno, mentol u otras moléculas cosméticamente aplicables. Antes se han descrito detalles.

Se considera que los compuestos de calixareno confinan la materia activa (si esta materia activa está contenida en la fase interna de la dispersión) de conformidad con dos mecanismos: Primero, las partículas de dicha materia activa están simplemente circundadas por una carcasa esférica de una red de calixareno, pero en adición, se retienen fracciones específicas de la materia activa por las cavidades moleculares de las moléculas de calixareno y/o son atrapadas por fuerzas químicas o físicas secundarias tal como puentes de hidrógeno y fuerzas van der Waals.

Así pues la materia activa es retenida de forma bastante sólida por las redes de calixareno. La liberación de materia activa se controla por una o mas de las medidas siguientes:

1) Elevación de temperatura: En caso de aumentarse la temperatura de la nanodispersión, por ejemplo hasta 60°C, se aumenta la liberación de la materia activa.

2) Cambio del valor pH: En caso de que descienda el pH, la velocidad de liberación aumenta drásticamente. Esto es de lo más probable debido a la destrucción de los enlaces de puente de hidrógeno entre el calixareno y la materia activa (véase antes) y a la rotura de la red de calixareno. El pH puede descender, cuando sea posible, hasta pH 3,0 a 2,5 o 2,0.

3) Influencias ambientales: Cuando la dispersión se pone en contacto con el ambiente al que debe aplicarse la materia activa, por ejemplo a la piel humana si la dispersión es un cosmético y contiene una sustancia cosméticamente activa, las secreciones de la piel o la presencia de ciertos aminoácidos en las proteínas acelerarán la liberación de la materia activa mediante atracción química y/o física; se altera la fase externa de la dispersión, y se modifica el equilibrio de la dispersión.

En general cualquier cambio del equilibrio de la dispersión influenciará la velocidad de liberación de la materia activa.

Por otra parte las nuevas nanopartículas a base de calixareno que están presentes como dispersiones coloidales, tienen una estabilidad de largo tiempo inesperadamente alta en soluciones de sal diluidas. Por ejemplo, estas dispersiones son estables durante más de 250 días a temperatura ambiente y a 40°C en presencia de sulfato sódico, acetato sódico, bicarbonato sódico, cloruro potásico, dihidrofosfato potásico y yoduro potásico hasta concentraciones de sal entre 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-2</sup>, en algunos casos hasta 10<sup>-1</sup> mol/l. Un aumento en el tamaño de partícula, que puede interpretarse como una agregación parcial, se observa antes de la destrucción del coloide mediante precipitación.

Como ya se ha indicado antes las nuevas dispersiones de nanopartículas pueden utilizarse en una amplia variedad de campos. Se prefieren aplicaciones en cosméticos, medicina, agricultura (fitosanitaria) e industria alimenticia. La toxicidad de las nuevas composiciones se ha probado de conformidad con tres métodos.

Primero se probaron p-acilcalix[4]arenos fosforilados sobre células de limfoblasto humanas utilizando vinblastina como una sustancia activa. Se encontraron valores de viabilidad entre 91 y 97%.

Segundo, se ha probado p-dodecanoil-calix[4]areno sobre células de insecto embrionario (*trichiopusia ni*). Se encontraron valores de viabilidad de más del 80%.

Tercero, se han llevado a cabo pruebas hemolíticas utilizando cinco p-acilcalix[4]arenos diferentes sobre células de sangre humana. Se ha determinado la liberación de hemoglobina que indica una hemólisis. No se ha detectado presencia de hemoglobina libre en todos los cinco casos a concentraciones de calixareno entre 15 y 150 mg/l a 37°C durante 30 minutos.

Así pues, la ausencia completa de toxicidad (los resultados de pruebas de células embrionarias de insectos no puede tomarse como indicativo para toxicidad de células humanas pero indican una toxicidad extraordinariamente baja *per se*) hace las nuevas composiciones totalmente compatibles con exigencias preliminares para uso médico y otros usos humanos.

### Descripción detallada del invento

El invento se ilustra por medio de los ejemplos siguientes que no deben considerarse en modo alguno limitativos del invento:

#### Parte I

##### Preparación de calixarenos p-sustituídos

##### Síntesis de hexa-p-dodecanoil-calix[6]areno

Bajo un manto de nitrógeno se adiciona 6,3 g (120 val) de cloruro de aluminio anhidro bajo condiciones anhidras a 200 ml de nitrobenzono seco. Se agita la solución naranja intenso durante 20 horas a temperatura ambiente. Luego se enfría la reacción mediante vertido de la mezcla reaccional sobre 1 kg de hielo. Se extrae el producto de reacción con cloroformo, se lava sucesivamente con 500 ml de ácido clorhídrico 1M, 2.500 ml de solución de NaCl 1M, y 2.500 ml de agua desionizada. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio y se evapora el disolvente en vacío hasta un volumen final de 50 ml. El residuo naranja parduzco se adiciona a 500 ml de metanol, y se separa por filtración el precipitado fino y se seca en vacío. El polvo blanco así obtenido se analiza mediante RMN y se determina la estructura del hexa-p-dodecanoil-calix[6]areno. Rendimiento del 50%.

Modificando las cantidades del componente de calixareno y utilizando las mismas condiciones de reacción y técnicas operativas se obtienen otros p-dodecanoil-calixarenos y otros p-acil-calixarenos con rendimientos entre 50 y 85%.

Parte II

*Preparación de composiciones de nanoesferas*

5 Ejemplo 1

*Preparación de una dispersión de nanopartículas*

Este ejemplo ilustra la técnica operativa típica para la preparación de las composiciones de este invento.

10

La preparación de calixarenos modificada mediante acoplamiento de una cadena de acilo de 12 átomos de carbono en la posición para respecto de la función hidroxilo fenólica se describe, por ejemplo, en Sahahgaldian *et al.* (*loc. cit.*) Véase también el ejemplo A anterior.

15

Se disuelve el tetra-p-dodecanoil-calix[4]areno en un disolvente apropiado, en el caso de este ejemplo tetrahidrofurano, para generar la fase (2) (3 ml). Se adiciona la base (2) a una fase acuosa (3) (100 ml) bajo agitación magnética. El medio se vuelve inmediatamente opalescente mediante formación de nanoesferas de calix[4] modificada. El tamaño medio de las nanoesferas, medido mediante un difractor de haz de laser (4700 C de Malvern), es de 150 nm con un índice de dispersión medio de 0,1.

20

La suspensión puede concentrarse bajo presión reducida hasta el volumen deseado, por ejemplo 10 ml o alrededor.

El aspecto de la suspensión de nanoesferas permanece inalterado después de reposo durante un periodo prolongado (12 meses) y no existe signo, en particular, de sedimentación irreversible o de variación en el tamaño de las nanoesferas.

25

Ejemplo 2

(Variante del ejemplo 1)

30

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero adicionando la fase acuosa (3) a la fase de tetrahidrofurano (2). La dispersión de nanoesferas obtenida tiene las mismas características que las descritas en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

35

(Variante del ejemplo 1)

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero adicionando la fase de tetrahidrofurano (0,5 ml) a la fase acuosa (10 ml) sin agitación del medio. Las nanoesferas obtenidas tienen un tamaño de 145 nm y tienen un índice de dispersión medio de 0,11.

40

Ejemplo 4

(Variante del ejemplo 1)

45

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero con la adición de un agente tensoactivo (Tween, 0,1-1%, v/v) a la fase acuosa. Las nanoesferas obtenidas tienen un tamaño de 150 nm y un índice de dispersión medio de 0,3.

Ejemplo 5

50

*Preparación estéril de nanoesferas*

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, y la suspensión obtenida de nanoesferas se esteriliza luego en una autoclave de 120°C durante 15 minutos. El tamaño de partícula medio permanece esencialmente invariable después de esterilización.

55

Ejemplo 6

*Preparación liofilizada de nanoesferas de calix[4]areno modificado en la cadena de acilo de 12 carbonos*

60

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, y luego se liofiliza la suspensión. La adición de un crioprotector (maltosa, trehalosa y similares) no es esencial. El tamaño de partícula medio medido inmediatamente después del liofilizado permanece inalterado.

65

Ejemplo 7

*Preparación de nanoesferas de calix[4]areno para-galactosil-O-5-carbón modificado*

5 El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, sustituyendo el calix[4]areno modificado en la cadena de acilo de 12 carbonos por calix[4]areno para-galactosil-O-5-carbón modificado. El tamaño medio de las nanoesferas es de 110 nm con un índice de dispersión medio de 0,1.

Estas nanoesferas pueden esterilizarse en la autoclave y liofilizarse como para las citadas en el ejemplo 1.

10

Ejemplo 8

*Preparación de nanoesferas de calix[6]areno modificado en la cadena de acilo de 12 carbonos*

15 El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, sustituyendo el derivado de calix[4]areno respectivo por un derivado de calix[6]areno conteniendo 6 unidades fenólicas. El tamaño medio de las nano-esferas formadas es de 145 nm con un índice de alta polidispersidad de 0,21.

Ejemplo 9

20

*Preparación de nanoesferas de calix[8]areno modificado en la cadena de acilo de 12 carbonos*

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, sustituyendo el derivado de calix[4]areno respectivo por un derivado de calix[8]areno conteniendo 8 unidades fenólicas. Bajo estas condiciones se obtuvo también nanoesferas estables.

25

Ejemplo 10

*Preparación de nanoesferas de calix[n]areno modificado en la cadena de acilo de 12 carbonos, en donde n = 4, 6 y 8*

30

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, sustituyendo el derivado de calix[4]areno respectivo por una mezcla de calix[n]arenos modificado en la cadena de acilo de 12 carbonos, en las proporciones de 1:1 para mezclas binarias y 1:1:1 y 1:1:2 para mezclas terciarias.

35

TABLA 1

*Índice de diámetro y polidispersidad para suspensiones de nanoesferas mixtas (1: para-dodecanoil-calix[4]areno, 2: para-dodecanoil-calix[6]areno, y 3 para-dodecanoil-calix[8]areno)*

40

Proporción en 1	Proporción en 2	Proporción en 3	Diámetro en nm	Índice de polidispersidad
1/3	1/3	1/3	122	0,31
1/2	-	1/2	176	0,26
-	1/2	1/2	140	0,25
1/2	1/4	1/4	155	0,20
1/4	1/4	1/2	140	0,37

60

Ejemplo 11

*Estabilidad de las nanoesferas de calix[4]areno en presencia de resistencias iónicas*

65

El método se lleva a cabo como se ha indicado en el ejemplo 1. Después de concentración de la suspensión de las nanoesferas de calix[4]areno modificadas hasta un volumen de 10 ml, se adicionan cantidades en aumento de cloruro sódico. La suspensión de nanoesferas es perfectamente estable cuando la concentración de cloruro sódico corresponde

## ES 2 306 684 T3

a resistencia iónica fisiológica (0,154 M) y la estabilidad permanece a concentraciones de hasta un orden de magnitud superior a la resistencia iónica fisiológica.

### Ejemplo 12

5

#### *Estabilidad de las nanosferas de calix[n]areno en presencia de un medio ácido o básico*

El método se lleva a cabo como se ha indicado en el ejemplo 1. Después de concentración de la suspensión de las nanosferas de calixareno hasta un volumen de 10 ml, se adicionan progresivamente al medio cantidades en aumento de ácido clorhídrico (1 mol por litro) o de hidróxido sódico (1 mol por litro). La suspensión de nanosferas es perfectamente estable bajo pH que oscila de 1 a 12.

### Ejemplo 13

#### 15 *Estabilidad a la temperatura de las nanosferas de calix[n]areno*

El método se lleva a cabo como se ha indicado en el ejemplo 1. Después de la concentración de la suspensión de nanosferas de calix[n]areno hasta un volumen de 30 ml, se preparan tres partidas de 10 ml cada una. Las partidas se disponen a 3°C, 20°C y 40°C, respectivamente. Las suspensiones permanecen estables durante un tiempo y no exhiben, después de almacenamiento durante un mínimo de 12 meses, sedimentación irreversible o variación en el tamaño de las nanosferas.

### Ejemplo 14

#### 25 *Preparación de nanosferas en presencia de una sal*

El método se lleva a cabo como se indica en el ejemplo 1, utilizándose en este caso una solución de 0,154 mol/litro de cloruro sódico como fase (3). Las nanosferas se preparan bajo resistencia iónica fisiológica con un tamaño de 160 nm con un índice de dispersión de 0,15 nm.

30

La suspensión permanece estable con el tiempo y no exhibe, después de almacenamiento durante 12 meses, sedimentación irreversible o variación en el tamaño de las nanopartículas.

### Ejemplo 15

35

#### *Adición de no disolvente a la fase disolvente*

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero el calix[n]areno se disuelve en una mezcla de tetrahidrofurano/agua (90/10, v/v) en lugar de tetrahidrofurano puro. La presencia de una proporción baja de no disolvente para el calix[n]areno en un disolvente proporciona a las nanosferas que se obtienen, un tamaño medio de 160 nm con un índice de dispersión medio de 0,11.

### Ejemplo 16

#### 45 *Estabilidad de las nanosferas de calix[n]areno a la irradiación ultra-violeta*

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1. Después de concentración de la suspensión de nanosferas de calixareno hasta un volumen de 30 ml, se trata la suspensión resultante de nanosferas de calix[n]areno con irradiación ultra-violeta (254 nm) durante 12 horas, siendo el tamaño de las nanosferas después de irradiación 160 nm con un índice de dispersión medio de 0,15. La suspensión permanece estable con el tiempo y no exhibe, después de almacenamiento durante 12 meses, sedimentación irreversible o variación en el tamaño de las nanosferas.

50

### Ejemplo 17

#### 55 *Preparación de nanosferas en presencia de un principio lipofílico activo*

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero se adicionan 5 mg de  $\alpha$ -caroteno a la fase de disolvente (2). Las nanosferas obtenidas tienen un tamaño medio de 145 nm con un índice de dispersión de 0,12. El análisis mediante espectroscopia visible muestra >70% de incorporación de  $\alpha$ -caroteno.

60

No existe degradación del  $\alpha$ -caroteno durante un periodo de almacenamiento superior a 6 meses.

### Ejemplo 18

#### 65 *Preparación de nanosferas conteniendo mentol*

El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero se adicionan 10 mg de mentol a la fase orgánica. Las nanosferas obtenidas tienen un tamaño medio de 100 nm y un índice de dispersión medio de 0,14.

## ES 2 306 684 T3

### Ejemplo 19

#### *Preparación de nanoesferas en presencia de un aminoácido*

5 El método se lleva a cabo como en el ejemplo 1, pero se adiciona a la fase acuosa 10 mg de un aminoácido, por ejemplo alanina. Las nanoesferas obtenidas tienen un tamaño medio de 130 nm y un índice de dispersión medio de 0,12.

### Ejemplo 20

10

#### *Preparación de gel acuoso*

15	Fase A	Agua	84,5%
		Carbómero	0,5%
		Propilenglicol	15%
20	Fase B	Nanoesferas de calixareno	0,01% a 10%

25 La fase A se prepara calentando todos los constituyentes hasta 80°C, después de lo cual se homogeniza la mezcla. Se adiciona la fase B bajo vigorosa agitación. Se forma el gel mientras se enfría la mezcla. El tamaño de las nanoesferas no se mide debido a la viscosidad del gel resultante. Sin embargo no se observa sedimentación visual después de dos meses de almacenamiento a 4°C, 20°C y 40°C.

30 Las nanoesferas a base de calix[n]areno descritas en este invento pueden aplicarse en una amplia variedad de aplicaciones, como se ha descrito antes.

30

Las nanoesferas de este invento pueden así utilizarse, por ejemplo, para los fines siguientes:

- como modificaciones de las cinéticas de liberación de agentes, tal como retinal, para tratamiento dermal,
- 35 - como agentes para la estabilización de moléculas sensibles, tal como  $\alpha$ -caroteno, para aumentar la vida de almacenamiento de productos cosméticos,
- como agentes para modificar las propiedades aromáticas de productos cosméticos,
- 40 - como moduladores de propiedades tensoactivas de emulsificantes utilizados en productos cosméticos,
- como modulador de penetración dermal de moléculas activas,
- como agentes de dispersión para productos cosméticos utilizados en cremas de piel solares,
- 45 - como modificadores de las farmacocinéticas de la liberación de compuestos activos tal como cis-platin para el tratamiento de cáncer,
- como agentes para la estabilización de moléculas sensibles tal como ésteres grasos sensibles a lipasas, con el fin de aumentar la bioestabilidad de productos farmacéuticos,
- 50 - como agentes para modificar el sabor de medicaciones administradas oralmente,
- como moduladores para disminuir la cantidad de agentes saborizantes utilizados en procesos de cocción,
- 55 - como estabilizadores para aumentar la vida de moléculas sensibles a la oxidación utilizados en la industria alimenticia,
- como sistemas de liberación controlada para la liberación de medicaciones administradas oralmente al pH del estómago,
- 60 - como vehículos para el transporte selectivo de medicamentos a sitios biológicos predeterminados,
- como agentes de liberación controlada para feromonas para tratamientos insecticidas "en verde".
- 65

Su empleo en otros campos permitirá obtener efectos similares. Por ejemplo las nanopartículas son miscibles con lipoproteínas. La membrana plásmica de células vivientes es un constituyente esencial de la integridad estructural de

## ES 2 306 684 T3

células. Esta membrana comprende lípidos y proteínas y actúa no solo como una barrera física para separar diferentes compartimientos sino también como un sustrato para un gran número de reacciones que ocurren en su interior.

5 Estos lípidos en forma de membrana son moléculas anfifílicas. Esta ambivalencia de afinidad proporciona la capacidad de adsorción para interfases y la capacidad de autoestructuración en medios acuosos.

10 Los derivados de calixareno formadores de nanopartículas antes descritos, o sea calixarenos acilados de ácido graso de cadena larga de corona superior y fosforilados selectivos de corona inferior, especialmente los calix[4]arenos, muestran una alta tendencia a cristalizar, mientras que los fosfolípidos naturales tienen solo una baja capacidad de cristalización. Durante nuestro trabajo se han obtenido numerosos cristales de los calixarenos sustituidos.

15 Los estudios de capas monomoleculares de Langmuir han mostrado que nuestros calixarenos sintéticos, sustituidos como se ha descrito antes, son grandemente miscibles con fosfolípidos naturales (DPPA y DPPC). Las autoestructuraciones que se forman en agua se han estudiado como dinámicas de difusión de luz y microscopía de fuerza atómica. Los resultados muestran que estas estructuras supramoleculares son diferentes de las estructuras que se forman generalmente con lípidos; en efecto, las nuevas estructuras no son micelas ni liposomas (G. Gregoriadis, B.E. Ryman, *Liposomes as carriers of enzymes or drugs*, *Biochem. J.* 124 (1971), 58P) sino nanopartículas. Estas nanopartículas se distinguen de las otras estructuras antes citadas por su gran resistencia mecánica y su estabilidad duradera. Las nuevas estructuras de este invento pueden utilizarse también, por consiguiente, para la solubilización de proteínas de membrana y para la reconstitución de sistemas biomiméticos en donde se favorece el proceso de nucleación de cristal.

20

25

30

35

40

45

50

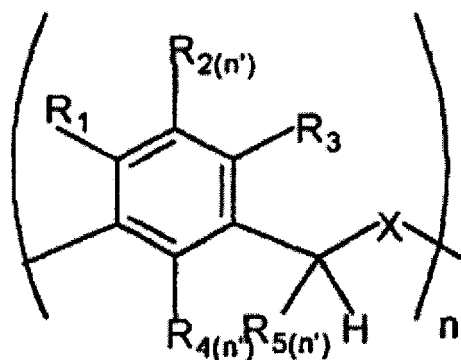
55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición coloidal dispersable, conteniendo nanopartículas que tienen un tamaño de 50 a 500 nm dispersadas en una fase continua externa conteniendo agua, en donde dichas nanopartículas comprenden por lo menos un calixareno anfifílicamente modificado.
- 10 2. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dichas nanopartículas son nanoesferas.
3. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, que contiene dichas nanopartículas como un vehículo y por lo menos una sustancia activa que ha de ser portada.
- 15 4. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicha sustancia activa está contenida dentro de dichas nanopartículas.
5. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicha sustancia activa está contenida en dicha fase continua externa.
- 20 6. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dichas nanopartículas y dicha fase continua externa contienen por lo menos una sustancia activa.
7. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición usado en cosmética.
- 25 8. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición usado en farmacia.
9. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición usado nutricionalmente.
- 30 10. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición usado para fines fitosanitarios.
- 35 11. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 1, en donde dicho calixareno modificado tiene la fórmula general



Formula 1

en donde:

- 55  $R_1 =$  H, OH, OR u OCOR;
- $R_2 =$  H, R, COR,  $CH_2$ Pol, Y o  $CH_2$ Y;
- 60  $R_3 =$  H, OH, OR u OCOR;
- $R_4 =$  H, OR,  $OCH_2$ R, OCOR o un éster, ácido carboxílico, amido, amino, péptido o grupo carbohidrato;
- $R_5 =$  R o Y;
- 65  $R =$  una cadena hidrocarbúrica lineal o ramificada saturada o insaturada que puede estar sustituida por halógeno y/o por un grupo Pol; o R es un radical hidrocarbúrico cíclico, saturado o no;

## ES 2 306 684 T3

Pol = un grupo polar elegido entre ácido fosfórico, ácido sulfúrico, amino, amonio, ácido carboxílico y sus sales;

Y = halógeno o pseudo-halógeno;

X = un enlace directo, O, S o  $\text{NR}_6\text{R}_7$ ;

$\text{R}_6$  = alquilo,

$\text{R}_7$  = alquilo,

n = un número entero de 3 a 20; y

n' = un número entero  $\leq$  n;

el compuesto de la fórmula anterior conteniendo por lo menos un grupo Pol.

12. La composición coloidal dispersable de la reivindicación 11, en donde dicho calixareno modificado se elige del grupo formado por tetra-p-acil-calix[4]arenos, tetra-p-acil[6]arenos y tetra-p-acil-calix[8]arenos en donde acilo es el residuo acilo de un ácido carboxílico que tiene de 8 a 16 átomos de carbono.

13. Un procedimiento para la preparación de una composición coloidal dispersable de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por las etapas siguientes:

(1) proporcionar por lo menos un calixareno sustituido anfifílico;

(2) proporcionar una fase líquida esencialmente constituida por una solución de dicho calixareno anfifílico en un disolvente orgánico;

(3) proporcionar una segunda fase líquida constituida por agua o una mezcla acuosa o solución iónica;

(4) combinar dichas dos fases líquidas de las etapas (2) y (3); y

(5) recuperar una suspensión coloidal de nanoesferas que contienen dicho calixareno anfifílicamente sustituido.

14. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 13, que comprende adicionalmente la etapa de adicionar una o más moléculas activas a por lo menos una de dichas fases líquidas preparadas en la etapa (2) y (3) con lo que después de llevar a cabo la etapa (4) la molécula activa es contenida dentro de las nanoesferas de matriz calix[n]areno modificada o dentro de dicha fase continua externa.

15. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 14, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición utilizado en cosmética.

16. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 14, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición utilizado en farmacia.

17. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 14, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición utilizado nutricionalmente.

18. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 14, en donde dicha sustancia activa es un compuesto o composición utilizado para fines fitosanitarios.

19. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 13, en donde la relación volumétrica de la primera fase líquida (2) frente a la segunda fase líquida (3) es de 0,1 a 1000.

20. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 13, que comprende además separar todo o parte del disolvente orgánico, y separar toda el agua o mezcla acuosa obteniéndose así un polvo de nanoesferas.

21. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 20, en donde se elimina toda el agua mediante liofilización.

22. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 13, que comprende además ajustar la concentración de la suspensión coloidal obtenida en la etapa (4) separando una parte del disolvente orgánico, y separando una parte del agua o mezcla acuosa, o mediante la adición de ulterior fase acuosa, pura o en forma de una solución.

23. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 13, en donde por lo menos una de dichas fases líquida comprende un tensoactivo no iónico o iónico.

## ES 2 306 684 T3

24. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 23, en donde el tensoactivo está presente en una proporción de 0,1 a 50% en peso de la suspensión coloidal recuperada en la etapa (5).

5 25. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 13, que comprende adicionalmente incorporar dicha suspensión coloidal recuperada en la etapa (5) en un gel o una emulsión.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65