

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 914**

51 Int. Cl.:

A61K 8/02	(2006.01)
A61K 8/43	(2006.01)
A61K 8/67	(2006.01)
A61K 8/86	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01)
A61K 31/07	(2006.01)
A61K 38/28	(2006.01)
A61K 47/22	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2017 PCT/GB2017/051336**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2017 WO17194965**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2017 E 17724421 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023 EP 3454821**

54 Título: **Micelas de succinato 1000 de polietilenglicol de d-alfa-tocoferilo**

30 Prioridad:

13.05.2016 GB 201608470

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2024

73 Titular/es:

**PHYTOCEUTICAL LIMITED (100.0%)
Harrow Cottage North Street
Midhurst, West Sussex GU29 9DJ, GB**

72 Inventor/es:

**BUCHANAN, WILL y
FAIRHURST, DAVID**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 965 914 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

Micelas de succinato 1000 de polietilenglicol de d-alfa-tocoferilo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición y una formulación cosmética que comprende la composición. La composición y la composición cosmética pueden ser de utilidad para administración de agentes terapéuticos bioactivos, por ejemplo, vitaminas o productos cosméticos.

10

Antecedentes de la invención

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la producción de micelas es que las micelas tienen una elevada capacidad de carga y frecuentemente son grandes e inestables, lo que pone límites a su aplicación, especialmente para la administración de agentes cosméticos o terapéuticos.

15

Aleksov et al. (2001) (CA 2445478 A1) es una memoria descriptiva de patente que divulga derivados de retinol que potencian la eficacia de la actividad farmacológica de una formulación de paclitaxel (compuesto citotóxico utilizado en el tratamiento del cáncer), para permitir la fabricación de una nueva formulación de paclitaxel con solubilidad mejorada, propiedades de almacenamiento mejoradas y eficacia terapéutica aumentada.

20

Liu et al. (2009, Chemical Journal of Chinese Universities, 30: 297-301) es un estudio de las velocidades de descomposición del retinol y acetato de retinilo en diversas soluciones acuosas micelares y a diferentes temperaturas. Los autores demostraron que la descomposición del retinol y del acetato de retinilo es mucho más rápida en micelas aniónicas (SDS) que en micelas catiónicas (CTAB) y micelas neutras (TX-100). Los autores también descubrieron que las constantes de velocidad de la descomposición de ambas sustancias dependen fuertemente del pH.

25

Frederick et al. (2014) Liver Disease in Children (4ª Edición, Cambridge University Press, Reino Unido) proporciona una descripción de la absorción intestinal de las vitaminas liposolubles A, D, E y K. El documento divulga que la absorción de las vitaminas liposolubles es fuertemente dependiente de la adecuada secreción hepática de ácidos biliares en la luz intestinal. La absorción incorrecta de vitaminas liposolubles es habitual cuando las concentraciones intraluminales de ácidos biliares están por debajo de la concentración micelar crítica. El paso relevante describe el uso de agentes de unión a ácidos biliares como terapia potencial para coleostasia y que la administración de un líquido que contiene succinato de D- α -Tocoferilo polietilenglicol 1000 (denominado a partir de ahora en el presente documento como TPGS o vitamina E TPGS) y diversas vitaminas liposolubles no alivian la deficiencia de vitaminas liposolubles en niños pequeños.

30

35

Omathanu *et al.* (2012) (US20120219600 A1) es una memoria descriptiva de patente que divulga conjuntos de micelas, composiciones que tienen conjuntos de micelas y métodos para preparar conjuntos de micelas. El documento describe una proteína prolamina (zeína) conjugada a un polímero, tal como una cadena de polietilenglicol (PEG), donde el conjugado se puede usar para preparar conjuntos de micelas y también detalla métodos para encapsular moléculas usando los conjugados. Los conjuntos de micelas resultantes se pueden utilizar en una amplia variedad de aplicaciones, tales como tratamiento del cáncer, localización específica de tumores, reducción de la toxicidad de un fármaco *in vivo*, aumento de la eficacia de un agente encapsulante *in vivo*, protección de un agente encapsulado contra la degradación y mejorar la solubilidad en agua de un fármaco u otro agente.

40

45

Muthu et al. (2012, Nanomedicine (Lond) 7: 353-364) describe el uso de polietilenglicol (PEG) y vitamina E en el desarrollo de micelas cargadas con docetaxel de succinato de D- α -tocoferilo polietilenglicol 1000 (vitamina E TPGS o TPGS) para la quimioterapia contra el cáncer cerebral. La vitamina E TPGS combina las ventajas de la semivida prolongada del PEG con la elevada captación celular de la vitamina E. El TPGS tiene una concentración micelar crítica mucho más baja que la mayoría de fosfolípidos en formulación micelar, por lo que puede ser un eficaz portador de fármacos a través de la barrera hematoencefálica con elevada eficacia de encapsulación de fármaco, captación celular, citotoxicidad y biodistribución deseada del fármaco formulado. Las micelas de TPGS que contienen docetaxel o cumarina-6 se prepararon por un método de colada en disolvente y el método de disolución directa. El documento divulga que los tamaños de partícula de las micelas de TPGS cargadas con docetaxel están entre 12 nm y 14 nm y reivindica niveles de carga de fármaco "altos", "moderados" y "bajos".

50

55

Mi et al. (2012, Int J Pharm. 438: 98-106) divulga un sistema micelar profármacos de succinato de D- α -tocoferilo polietilenglicol 1000 (TPGS) con cisplatino como fármaco hidrófilo modelo para evitar desventajas tales como baja carga de fármaco y baja eficacia de encapsulación de fármaco debido a las pérdidas de fármaco asociadas con las formulaciones de "doble emulsión". El documento divulga que las micelas de TPGS administraron cisplatino con una concentración micelar crítica (CMC) baja de 5,01 mg/l, una elevada carga de fármaco del 4,95 % (p/p) y una cinética de liberación del fármaco sensible al pH y una elevada captación celular en comparación con el fármaco original y el propio producto de profármacos TPGS-cisplatino. El sistema de micelas de TPGS parece mejorar la quimioterapia con cisplatino, reduciendo los valores de CI50 en células de hepatocarcinoma HepG2, y tiene la ventaja de tener efectos neuroprotectores (un aumento del valor de la CI50 para células análogas a neuroblastos SH-SY5Y).

60

65

La publicidad acerca de la vitamina E TPGS de Antares Health Products (http://www.antareshealthproducts.com/personal_care.html) proporciona una lista de las aplicaciones de vitamina E TPGS en productos cosméticos y de higiene personal. El documento divulga, entre otros, que, además de proporciona una forma de vitamina E soluble en agua, el TPGS actúa como un emulsionante/excipientes exento de etanol, hipoalergénico y no irritante para productos cosméticos y de higiene personal y se puede utilizar para solubilizar sustancias activas poco solubles.

Papas et al. (2004) (US7790190 B2) es una memoria descriptiva de patente que divulga la adición de ácido linoleico a la fase lipídica de una emulsión acuosa que incluye una combinación de una concentración terapéuticamente eficaz de una sustancia lipófila y una concentración de Vitamina E TPGS. La presencia de ácido linoleico reduce la cantidad de Vitamina E TPGS que de lo contrario sería necesaria en la emulsión acuosa aumentando el efecto de solubilización de la Vitamina E TPGS en la sustancia lipófila.

Liang et al. (2013)(CA2537029 C) es una memoria descriptiva de patente que se dirige a formulaciones micelares inversas para la administración de compuestos hidrófobos o lipófilos, en particular compuestos terapéuticos; que comprende: (a) una fase hidrófila; (b) una fase hidrófoba continua; y (c) uno o más agentes terapéuticos hidrófobos biológicamente activos.

Huth et al. (2011)(US7923469 B2) es una memoria descriptiva de patente que divulga composiciones para limpiar y desinfectar lentes de contacto o para usar como soluciones para lavado ocular. Las composiciones descritas incluyen un medio líquido acuoso y un componente derivado de vitamina que actúa como tensioactivo.

Lee et al. (2010) Micellar Nanoparticles Applications for Topical and Passive Transdermal Drug Delivery (http://www.particlesciences.com/docs/Micellar_Nanoparticles-Applications_for_Topical.pdf) es un capítulo del Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Representa un resumen general de tecnologías de nanopartículas micelares (MNP) y describe las ventajas de las MNP, sus métodos de fabricación y aplicaciones para la administración tópica y transdérmica. Las MNP pueden alojar ingredientes farmacéuticos activos (API) tanto solubles en agua como poco solubles en agua, y presentan el API en una forma fácilmente biodisponible. La combinación de la tecnología MNP con los sistemas de administración transdérmica también pueden evitar el metabolismo de primer paso hepático o la degradación en el tracto gastrointestinal asociada con algunos fármacos. El documento revela que las nanoemulsiones multifásicas tales como los MNP tienen cinco componentes básicos: (i) uno o más API; (ii) disolvente; (iii) estabilizante; (iv) aceite; y (v) medio acuoso. Cuando estos componentes se mezclan entre sí y se someten a un proceso de molienda (asistido de mezclado de alta cizalladura o de alta presión), el API se presenta en una o más fracciones compuestas (Figura 2.1): materiales en forma de partículas sólidas (micro/nanopartículas), asociados a micelas, asociados a aceite y/o solubilizados (en medio acuoso y/o de disolvente).

El documento WO 2013/120532 A1 divulga una composición antimicrobiana que contiene complejos de plata fotoquímicamente estables y aductos micelares. En particular, la divulgación se refiere a un complejo neutro de plata monovalente de fórmula Ag-L, en donde Ag es un ion Ag⁺ y L es un ligando de fórmula ácido 4-mercaptofenilborónico, y en donde el ion plata está unido al grupo mercapto del ligando L. Además, la divulgación se refiere a aductos micelares formados entre dichos complejos y un tensioactivo catiónico.

El documento US 2006/073184 A1 divulga una composición viscoelástica que comprende una solución acuosa que tiene un polímero viscoelástico según el volumen total de la composición viscoelástica. El documento también divulga métodos para usar la nueva composición viscoelástica y un dispositivo de envasado.

Típicamente, uno de los problemas a los que se enfrenta la producción de micelas es que las micelas tienen una elevada capacidad de carga y frecuentemente son grandes, lo que pone límites a su aplicación, especialmente para la administración de agentes cosméticos o terapéuticos. Asimismo, frecuentemente también son inestables.

Es por tanto un objeto de la invención generar micelas que sean a la vez pequeñas y estables, pero que retengan una elevada capacidad de carga de agentes bioactivos. Los inventores han descubierto que el uso de TPGS en la construcción de micelas permite la producción de micelas que son pequeñas y estables pero que tienen una elevada capacidad de carga para la incorporación de agentes bioactivos, permitiendo una administración más eficaz de sustancia bioactivas.

Resumen de la invención

Los inventores han descubierto que el uso de TPGS (tanto con como sin polihexametilénbiguanida (PHMB) o PHMB tamponada) junto con un agente bioactivo terapéutico, en particular un principio activo liposoluble, (por ejemplo, retinol) permite la producción de micelas que son pequeñas y estables pero que tienen una elevada capacidad de carga para la incorporación de agentes bioactivos terapéuticos, lo que proporciona una administración más eficaz de sustancia bioactivas. La adición de PHMB o PHMB tamponado permite añadir desinfectante y antiséptico a la administración de micelas como una capa exterior que puede tener beneficios en determinadas aplicaciones y, adicionalmente, actúa como mecanismo de conservación para cualesquiera formulaciones que comprendan dichas micelas, y adicionalmente permite usar PHMB o Nanocin tamponado, y sus beneficios bioactivos conocidos, como sistema de administración, para alcanzar tamaños no anteriormente descritos ni conocidos con Nanocin sin la invención, donde en este caso, el Nanocin es un recubrimiento exterior que rodea la micela.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende micelas de un succinato de d- α -tocoferilo polietilenglicol 1000 (TPGS), polihexametilenbiguanida (PHMB) o PHMB tamponada y un agente bioactivo terapéutico en medio acuoso; en donde las micelas de la composición no superan los 31 nm. La composición del primer aspecto se puede denominar composición micelar.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona una formulación cosmética que comprende la composición del primer aspecto.

Preferiblemente, la composición de micelas está en forma de una crema, loción, gel, semisólido, dispersión, suspensión, espuma, mousse o pulverización.

Las micelas de la composición pueden no superar los 30 nm, 29 nm, 28 nm, 27 nm, 26 nm, 25 nm, 24 nm, 23 nm, 22 nm, 21 nm, 20 nm, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nm, 14 nm, 13 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm, 9 nm u 8 nm. Preferiblemente, las micelas de la composición no superan los 25 nm. Más preferiblemente, las micelas no superan los 20 nm.

La composición de la invención reivindicada comprende micelas que incluyen un agente bioactivo terapéutico. Se pueden usar micelas que comprenden TPGS o PHMB para encapsular una gama de agentes bioactivos terapéuticos como carga útil. Típicamente, la composición puede comprender más de un agente bioactivo terapéutico. Preferiblemente, el agente bioactivo terapéutico es una vitamina liposoluble, que se puede proporcionar en solitario o junto con otra vitamina liposoluble.

Preferiblemente, el agente bioactivo terapéutico es un principio activo liposoluble. Preferiblemente, el principio activo liposoluble es una vitamina liposoluble, preferiblemente una vitamina aromática liposoluble. Por ejemplo, el agente bioactivo terapéutico puede ser retinol, tocotrienol y/o tocoferol. El agente bioactivo terapéutico puede ser otro principio activo liposoluble, por ejemplo, palmitato de retinilo. Incluso más preferiblemente, el principio activo liposoluble es retinol.

En determinadas formas de realización, puede ser deseable incorporar más de un agente bioactivo terapéutico a la composición micelar. Por tanto, la composición micelar puede comprender retinol y palmitato de ascorbilo. Cuando la composición micelar comprende retinol y palmitato de ascorbilo, la relación entre el retinol y el palmitato de ascorbilo puede ser 90:10. De forma alternativa, la relación entre el retinol y el palmitato de ascorbilo puede ser 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 89:11, 88:12, 87:13, 86:14, 85:15, 84:16, 83:17, 82:18, 81:19, 80:20, 79:21, 78:22, 77:23, 76:24, 75:25, 74:26, 73:27, 72:28, 71:29, 70:30, 69:31, 68:32, 67:33, 66:34, 65:35, 64:36, 63:37, 62:38, 61:39, 60:40, 59:41, 58:42, 57:43, 56:44, 55:45, 54:46, 53:47, 52:48, 51:49, 50:50, 49:51, 48:52, 47:53, 46:54, 45:55, 44:56, 43:57, 42:58, 41:59, 40:60, 39:61, 38:62, 37:63, 36:64, 35:65, 34:66, 33:67, 32:68, 31:69, 30:70, 29:71, 28:72, 27:73, 26:74, 25:75, 24:76, 23:77, 22:78, 21:79, 20:80, 19:81, 18:82, 17:83, 16:84, 15:85, 14:86, 13:87, 12:88, 11:89 o 10:90. Preferiblemente, la relación entre el retinol y el palmitato de ascorbilo puede ser 50:50.

En la composición micelar de la invención, el TPGS acuoso puede comprender además un agente hidrosoluble. Preferiblemente, el agente hidrosoluble PHMB tamponado, por ejemplo Nanocin™.

Cuando la composición micelar comprende retinol y palmitato de ascorbilo, las micelas de la composición pueden no superar los 25 nm, 24 nm, 23 nm, 22 nm, 21 nm, 20 nm, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nm, 14 nm, 13 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm, 9 nm u 8 nm. Preferiblemente, las micelas de la composición no superan los 20 nm.

Preferiblemente, el TPGS acuoso comprende además un agente hidrosoluble.

Más preferiblemente, el agente hidrosoluble es PHMB. PHMB puede ser, por ejemplo, PHMB tamponado (Nanocin™).

Opcionalmente, el agente hidrosoluble puede ser, o puede comprender además, un principio activo hidrosoluble como insulina, ácido ascórbico o ácido L-ascórbico.

La presente divulgación describe, pero no reivindica, un método para producir una composición micelar, en donde las micelas no superan los 100 nm, que comprende las etapas de;

- a) disolver un principio activo liposoluble en un disolvente orgánico para proporcionar una fase hidrófoba;
- b) añadir la fase hidrófoba al TPGS acuoso; y
- c) eliminar al menos una parte del disolvente orgánico.

Preferiblemente, la fase hidrófoba se añade al TPGS acuoso a una concentración en el intervalo de 1 % al 20 %. Como alternativa, la fase hidrófoba puede estar en el intervalo de 2 % al 19 %, 3 % al 18 %, 4 % al 17 %, 5 % al 16 %, 6 % al 15 %, 7 % al 14 %, 8 % al 13 %, 9 % al 12 %, 2 % al 20 %, 3 % al 20 %, 4 % al 20 %, 5 % al 20 %, 6 % al 20 %, 7 % al 20 %, 8 % al 20 %, 9 % al 20 %, 10 % al 20 %, 11 % al 20 %, 12 % al 20 %, 13 % al 20 %, 14 % al 20 %, 15 % al 20 %, 16 % al 20 %, 17 % al 20 %, 18 % al 20 %, 19 %, 19,5 % o 20 %. Más preferiblemente, la fase hidrófoba se añade al TPGS acuoso a una concentración del 10 %.

Como se ha indicado anteriormente, las micelas de la composición del primer aspecto incluyen un agente bioactivo

terapéutico. Se puede usar una gama de disolventes admisibles junto con los métodos de la presente divulgación para solubilizar los agentes bioactivos para su encapsulación en micelas dependiendo de la aplicación elegida. Los disolventes adecuados dependerán de la sustancia bioactiva que se va a incorporar a la composición micelar y se pueden seleccionar en consecuencia. Si se pretende incorporar solamente una sustancia bioactiva en la composición micelar, por ejemplo, retinol, entonces, un disolvente apropiado será aquel en el que la sustancia bioactiva elegida sea soluble. Dependiendo de la aplicación deseada, también se puede usar una mezcla de disolventes miscibles. Análogamente, si se pretende incorporar más de una sustancia bioactiva en la composición micelar, por ejemplo, retinol y palmitato de ascorbilo, entonces, un disolvente apropiado será aquel en el que ambas sustancias bioactivas elegidas sean solubles. El disolvente orgánico puede ser un disolvente orgánico volátil y puede incluir, aunque no de forma limitativa, uno seleccionado de; disolventes GRAS (por ejemplo, ácido acético, anisol, butirato de butilo, 1,3-butilenglicol, etanol, acetato de etilo, benzoato de etilo, butirato de etilo, decanoato de etilo, formiato de etilo, hexanoato de etilo, lactato de etilo, dicloruro de etileno, glicerina, glicerol, monooleato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, alcohol isopropílico, citrato de isopropilo, ácido láctico, ácido linoleico, acetato de metilo, ácido octanoico, ácido propiónico, acetato de propilo, ácido esteárico, agua, vainillina de etilo, limoneno) o etanol. El disolvente orgánico es preferiblemente un alcohol. Más preferiblemente, el disolvente orgánico es un alcohol con una cadena de carbono de longitud C2-C6. El disolvente orgánico es preferiblemente etanol.

Preferiblemente, al menos una porción del disolvente orgánico volátil se elimina sometiendo la composición micelar a un vacío o calentamiento o a una combinación de los mismos.

Preferiblemente, el disolvente orgánico volátil se elimina sometiendo la composición micelar a calentamiento y vacío. En los métodos donde se aplica calentamiento, tanto en solitario o junto con otros métodos tales como la aplicación de un vacío, preferiblemente, la temperatura utilizada para eliminar el disolvente orgánico volátil estará entre 50 °C y 60 °C.

Se observa que, de acuerdo con este método de formación de micelas, si la micela deseada comprende retinol y palmitato de ascorbilo en una relación de 20:80 (retinol:palmitato de ascorbilo) y menor (es decir, relaciones de 20:80, 19:81, 18:82, 17:83, 16:84, 15:85, 14:86, 13:87, 12:88, 11:89 o 10:90) entonces la etapa c) del método; es decir, eliminar al menos una parte del disolvente orgánico, se puede omitir. Para relaciones superiores, la eliminación de al menos una porción del disolvente orgánico o evita la formación de micelas.

El principio activo liposoluble puede comprender una vitamina liposoluble. Preferiblemente, la vitamina liposoluble es una vitamina aromática liposoluble. Más preferiblemente, la vitamina liposoluble es retinol, tocotrienol y/o tocoferol. El principio activo liposoluble puede ser, por ejemplo, palmitato de retinilo.

Preferiblemente, las micelas no superan los 30 nm, 29 nm, 28 nm, 27 nm, 26 nm, 25 nm, 24 nm, 23 nm, 22 nm, 21 nm, 20 nm, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nm, 14 nm, 13 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm, 9 nm u 8 nm. Preferiblemente, las micelas de la composición no superan los 25 nm. Más preferiblemente, las micelas no superan los 20 nm.

En una forma de realización especialmente preferida, el principio activo liposoluble es retinol y las micelas no superan los 20 nm.

Preferiblemente, el TPGS acuoso puede comprender además un agente hidrosoluble.

Más preferiblemente, el agente hidrosoluble es PHMB. PHMB puede ser, por ejemplo, PHMB tamponado (Nanocin™).

El agente hidrosoluble puede ser, o además comprende, un principio activo hidrosoluble como insulina, ácido ascórbico o ácido L-ascórbico.

La presente divulgación también describe, pero no reivindica, un método para producir una composición micelar (inversa), en donde las micelas no superan los 100 nm, que comprende las etapas de;

- a) disolver TPGS en un principio activo liposoluble a una concentración no superior al 20 % (p/p) para proporcionar una primera solución; y
- b) añadir una fase acuosa a la primera solución en una proporción no superior a 1 parte de fase acuosa a 4 partes de primera solución (p/p).

El principio activo liposoluble puede ser una vitamina liposoluble. Preferiblemente, el principio activo liposoluble es una vitamina aromática liposoluble, por ejemplo, incluidas, aunque no de forma limitativa, retinol, tocoferol o tocotrienol. El principio activo liposoluble puede comprender de forma alternativa una vitamina liposoluble, por ejemplo, palmitato de retinilo. Más preferiblemente, la vitamina liposoluble es retinol.

Según este método, la cantidad de TPGS a disolver en el principio activo liposoluble no superará el 20 % (p/p). Preferiblemente, la cantidad de TPGS a disolver en el principio activo liposoluble no superará el 10 % (p/p). Como alternativa, la cantidad de TPGS a disolver en el principio activo liposoluble no superará el 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p), 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p), 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p), 0,5 % (p/p). Más preferiblemente, la cantidad de TPGS que

se puede añadir al principio activo liposoluble no superará el 5 % (p/p).

Es posible que la cantidad de principio activo liposoluble que puede disolver el TPGS no supere el 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p), 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p), 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p) o 0,5 % (p/p).

Opcionalmente, la fase acuosa comprende un principio activo hidrosoluble. El principio activo hidrosoluble puede ser, por ejemplo, PHMB, PHMB tamponado (Nanocin™), insulina, ácido ascórbico o ácido L-ascórbico. Preferiblemente, el principio activo hidrosoluble es PHMB o PHMB tamponado (Nanocin™).

Según este método, la cantidad de fase acuosa que se añade a la primera solución no superará el 20 % (p/p). La fase acuosa se añade a la primera solución en una proporción no superior a 1 parte de fase acuosa a 4 partes de primera solución (p/p). Más preferiblemente, la cantidad de fase acuosa que se puede añadir a la primera solución es del 10 % (p/p). Como alternativa, es posible que la cantidad de fase acuosa que se puede añadir a la primera solución no supere el 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p), 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p), 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p), 0,5 % (p/p).

Opcionalmente, la vitamina liposoluble puede ser retinol. Cuando la vitamina liposoluble es retinol, las micelas pueden no superar los 25 nm. Como alternativa, las micelas de la composición donde la vitamina liposoluble es retinol pueden no superar los 24 nm, 23 nm, 22 nm, 21 nm, 20 nm, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nm, 14 nm, 13 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm o 5 nm. Preferiblemente, cuando la vitamina liposoluble es retinol, las micelas de la composición no superan los 25 nm. Más preferiblemente, cuando la vitamina liposoluble es retinol, las micelas no superan los 20 nm. Más preferiblemente, cuando el retinol se proporciona en la fase externa y la PHMB tamponada (Nanocin™) en la interna acuosa, las micelas no superan los 25 nm.

Asimismo, el principio activo liposoluble puede ser retinol, y puede proporcionarse él mismo como una micela (inversa), por ejemplo, agua o un principio activo hidrosoluble encapsulado por retinol y/o TPGS.

Opcionalmente, la fase acuosa comprende un principio activo hidrosoluble. El principio activo hidrosoluble puede ser, por ejemplo, PHMB, PHMB tamponado (Nanocin™), insulina o ácido ascórbico. Preferiblemente, el principio activo hidrosoluble es PHMB o PHMB tamponado (Nanocin™). Preferiblemente, las micelas no superan los 25 nm. Como alternativa, las micelas de la composición pueden no superar los 24 nm, 23 nm, 22 nm, 21 nm, 20 nm, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nm, 14 nm, 13 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm o 5 nm. Preferiblemente, cuando la vitamina liposoluble es retinol, las micelas de la composición no superan los 25 nm. Más preferiblemente, cuando la vitamina liposoluble es retinol, las micelas no superan los 20 nm.

La presente divulgación también describe, pero no reivindica, un método para preparar una composición micelar que comprende las etapas de;

- a) proporcionar una composición micelar con una fase hidrófila externa; y
- b) añadir la composición micelar con una fase hidrófila externa a una solución que comprende TPGS solubilizado en una vitamina liposoluble.

Ventajosamente, la composición es una composición micelar doble que se proporciona proporcionando una composición micelar con una fase hidrófila externa; y añadiendo la composición micelar con una fase hidrófila externa a una solución que comprende TPGS solubilizado en una vitamina liposoluble, por ejemplo, retinol, tocotrienol o tocoferol.

La composición micelar con una fase hidrófila externa puede obtenerse opcionalmente al;

- a) disolver un principio activo liposoluble en un disolvente orgánico para proporcionar una fase hidrófoba;
- b) añadir la fase hidrófoba al TPGS acuoso; y
- c) eliminar al menos una parte del disolvente orgánico.

Opcionalmente, la vitamina liposoluble puede ser retinol y puede proporcionarse él mismo como una micela que comprende retinol disuelto en TPGS.

Asimismo, el principio activo liposoluble puede ser retinol, y puede proporcionarse él mismo como una micela (inversa), por ejemplo, agua o un principio activo hidrosoluble encapsulado por retinol y/o TPGS. Por ejemplo, cuando el TPGS puede estar disuelto en retinol, seguido por la adición de agua donde el TPGS es un 0-20 % (p/p) y el agua es un 0-20 % (p/p). La fase acuosa puede comprender Nanocin™ o PFIMB tamponada. El TPGS supone preferiblemente un 10 % (p/p). El agua supone preferiblemente un 10 % (p/p) o 5 % (p/p).

La presente divulgación también describe, pero no reivindica, un método para preparar una composición micelar que comprende las etapas de;

- 5 a) proporcionar una composición micelar con una fase oleosa interna; y
 b) añadir la composición micelar con una fase oleosa interna a una solución acuosa de TPGS, en una proporción no superior a 1 parte de la composición micelar con fase oleosa interna a 4 partes de solución acuosa de TPGS (p/p).

Preferiblemente, la composición micelar con una fase oleosa interna comprenderá TPGS, PHMB y retinol. Como alternativa, la composición micelar con fase oleosa interna comprenderá TPGS, retinol y agua.

- 10 Preferiblemente, la cantidad de composición micelar con fase oleosa interna que se puede añadir a la solución acuosa de TPGS no superará el 20 % (p/p). Más preferiblemente, la cantidad de composición micelar con fase oleosa interna que se puede añadir a la solución acuosa de TPGS es del 10 % (p/p). Como alternativa, la cantidad de composición micelar con fase oleosa interna que se puede añadir a la solución acuosa de TPGS puede no superar el 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p), 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p),
 15 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p), 0,5 % (p/p).

La presente divulgación también describe, pero no reivindica, un método para producir una composición micelar, en donde las micelas no superan los 100 nm y preferiblemente no superan los 25 nm, que comprende las etapas de;

- 20 a. disolver un principio activo liposoluble en una solución acuosa de TPGS a una concentración no superior al 20 % (p/p) para proporcionar una primera solución;
 b. disolver TPGS en una vitamina liposoluble para proporcionar una segunda solución; y
 25 c. añadir la primera solución a la segunda solución en una proporción no superior a 1 parte de la primera solución de fase acuosa a 4 partes de la segunda solución (p/p).

- Opcionalmente, el principio activo liposoluble puede ser una vitamina liposoluble, preferiblemente una vitamina aromática liposoluble. El principio activo liposoluble puede ser retinol, tocotrienol y/o tocoferol. Como alternativa, el principio activo liposoluble puede ser, por ejemplo, palmitato de retinilo. Incluso más preferiblemente, el principio activo liposoluble es retinol. Según este método, al proporcionar la primera solución, la cantidad de principio activo liposoluble que se puede disolver en una solución acuosa de TPGS no superará el 20 % (p/p). Preferiblemente, la cantidad de principio activo liposoluble que se puede disolver en una solución acuosa de TPGS no superará el 10 % (p/p). Como alternativa, la cantidad de principio activo liposoluble que se puede disolver en una solución acuosa de TPGS puede no superar el 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p), 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p), 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p), 0,5 % (p/p). Más preferiblemente, la cantidad de principio activo liposoluble que se puede disolver en una solución acuosa de TPGS no superará el 5 % (p/p).

- Según este método, al proporcionar la segunda solución, la cantidad de TPGS que se puede disolver en una vitamina liposoluble no superará el 20 % (p/p). Preferiblemente, la cantidad de TPGS disuelto en la vitamina activa liposoluble no superará el 10 % (p/p). Como alternativa, la cantidad de TPGS disuelto en la vitamina liposoluble puede no superar el 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p), 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p), 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p), 0,5 % (p/p). Más preferiblemente, la cantidad de TPGS que se puede añadir a la vitamina liposoluble no superará el 5 % (p/p).

- Según este método, la primera solución (que comprende principio activo liposoluble disuelto en una solución acuosa de TPGS) se añade a la segunda solución (que comprende TPGS disuelto en una vitamina liposoluble) en una proporción no superior de 1 parte de la primera solución en fase acuosa a 4 partes de la segunda solución. Preferiblemente, la cantidad de primera solución que se puede añadir a la segunda solución puede no superar el 20 % (p/p), 19 % (p/p), 18 % (p/p), 17 % (p/p), 16 % (p/p), 15 % (p/p), 14 % (p/p), 13 % (p/p), 12 % (p/p), 11 % (p/p) o 10 % (p/p). Preferiblemente, la cantidad de primera solución que se puede añadir a la segunda solución puede no superar el 10 % (p/p), 9 % (p/p), 8 % (p/p), 7 % (p/p), 6 % (p/p), 5 % (p/p), 4 % (p/p), 3 % (p/p), 2 % (p/p), 1 % (p/p), 0,5 % (p/p).

- La presente invención permite producir pequeñas micelas estables con una elevada capacidad de carga mediante el uso de un agente bioactivo terapéutico, en particular, un principio activo liposoluble (por ejemplo retinol) junto con TPGS (con y sin PFIMB o PHMB tamponado o B o Nanocin).

- La capacidad de carga de las micelas se mide en p/p de TPGS y del agente bioactivo terapéutico. En el caso de las micelas, la "elevada capacidad de carga" está en el intervalo de 0,1 - 20 % de fase oleosa interna. Por tanto, la capacidad de carga puede estar en el intervalo de 0,1 - 20 % (p/p), 1 - 20 % (p/p), 2 - 20 % (p/p), 3 - 20 % (p/p), 4 - 20 % (p/p), 5 - 20 % (p/p), 6 - 20 % (p/p), 7 - 20 % (p/p), 8 - 20 % (p/p), 9 - 20 % (p/p), 10 - 20 % (p/p), 11 - 20 % (p/p), 12 - 20 % (p/p), 13 - 20 % (p/p), 14 - 20 % (p/p), 15 - 20 % (p/p), 16 - 20 % (p/p), 17 - 20 % (p/p), 18 - 20 % (p/p) o 19 - 20 % (p/p). Como alternativa, la capacidad de carga de las micelas puede estar en el intervalo de 0,1 - 20 % (p/p), 1 - 19 % (p/p), 1 - 18 % (p/p), 1 - 17 % (p/p), 1 - 16 % (p/p), 1 - 15 % (p/p), 1 - 14 % (p/p), 1 - 13 % (p/p), 1 - 12 % (p/p), 1 - 11 % (p/p), 1 - 12 % (p/p), 1 - 11 % (p/p), 1 - 10 % (p/p), 1 - 9 % (p/p), 1 - 8 % (p/p), 1 - 7 % (p/p), 1 - 6 % (p/p), 1 - 5 % (p/p), 1 - 4 % (p/p), 1 - 3 % (p/p) o 1 - 2 % (p/p). Preferiblemente, la capacidad de carga de las micelas puede estar en el intervalo de 1 - 20 %

(p/p), 2 - 19 % (p/p), 3 - 18 % (p/p), 4 - 17 % (p/p), 5 - 16 % (p/p), 6 - 15 % (p/p), 7 - 14 % (p/p), 8 - 13 % (p/p), 9 - 12 % (p/p), 10 - 11 % (p/p).

5 Esto es similar en el caso de las micelas inversas generadas de acuerdo con la divulgación, donde la fase oleosa externa es un agente bioactivo terapéutico, en particular un principio activo liposoluble (por ejemplo, retinol) y la fase interna es una fase acuosa (por ejemplo, Nanocin o una sustancia bioactiva soluble en agua), la capacidad de carga de las micelas (fase acuosa interna). La capacidad de carga de las micelas inversas se mide en p/p de TPGS y del agente bioactivo terapéutico. En el caso de las micelas inversas, la "elevada capacidad de carga" está en el intervalo de 0,1 - 20 % de fase acuosa interna. Por tanto, la capacidad de carga puede estar en el intervalo de 0,1 - 20 % (p/p), 1 - 20 % (p/p), 2 - 20 % (p/p), 3 - 20 % (p/p), 4 - 20 % (p/p), 5 - 20 % (p/p), 6 - 20 % (p/p), 7 - 20 % (p/p), 8 - 20 % (p/p), 9 - 20 % (p/p), 10 - 20 % (p/p), 11 - 20 % (p/p), 12 - 20 % (p/p), 13 - 20 % (p/p), 14 - 20 % (p/p), 15 - 20 % (p/p), 16 - 20 % (p/p), 17 - 20 % (p/p), 18 - 20 % (p/p) o 19 - 20 % (p/p). Como alternativa, la capacidad de carga de las micelas inversas puede estar en el intervalo de 0,1 - 20 % (p/p), 1 - 19 % (p/p), 1 - 18 % (p/p), 1 - 17 % (p/p), 1 - 16 % (p/p), 1 - 15 % (p/p), 1 - 14 % (p/p), 1 - 13 % (p/p), 1 - 12 % (p/p), 1 - 11 % (p/p), 1 - 12 % (p/p), 1 - 11 % (p/p), 1 - 10 % (p/p), 1 - 9 % (p/p), 1 - 8 % (p/p), 1 - 7 % (p/p), 1 - 6 % (p/p), 1 - 5 % (p/p), 1 - 4 % (p/p), 1 - 3 % (p/p) o 1 - 2 % (p/p). Preferiblemente, la capacidad de carga de las micelas inversas puede estar en el intervalo de 1 - 20 % (p/p), 2 - 19 % (p/p), 3 - 18 % (p/p), 4 - 17 % (p/p), 5 - 16 % (p/p), 6 - 15 % (p/p), 7 - 14 % (p/p), 8 - 13 % (p/p), 9 - 12 % (p/p), 10 - 11 % (p/p).

20 **Breve descripción de las figuras**

La presente divulgación se describirá ahora de manera detallada en referencia a los ejemplos y en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

25 La **Figura 1** muestra el tamaño de nanopartículas de retinol disueltas en etanol absoluto con diferentes concentraciones de Nanocin™.

30 La **Figura 2** muestra micelas con TPGS, retinol y Nanocin™ mostrando un tamaño nanométrico. El Panel A muestra el tamaño de las nanopartículas de una solución micelar de retinol al 5 % con diferentes concentraciones de Nanocin™. El Panel B muestra los resultados de retinol micelar al 5 % sin Nanocin™ (en ambos casos con TPGS).

35 La **Figura 3** muestra una comparación entre la concentración de partículas para la incubación de retinol y Nanocin™ (en etanol) después de 2 días a 4 °C con, o sin, calentamiento a 37 °C antes de la lectura.

La **Figura 4** muestra la distribución de tamaño de partícula para retinol:Nanocin™ 1:3 en etanol.

40 La **Figura 5** muestra la absorbancia cinética de nanopartículas de retinol disueltas en etanol absoluto con diferentes concentraciones de Nanocin™ durante un almacenamiento de 24 h (línea roja: 10 mg/ml de retinol en solitario, línea azul: 10 mg/ml de retinol con 10 mg/ml de Nanocin™, línea verde: 10 mg/ml de retinol con 50 mg/ml de Nanocin™ y línea marrón: 10 mg/ml de retinol con 100 mg/ml de Nanocin™). Eje X: tiempo (s); Eje Y: absorbancia cinética (405 nm).

45 La **Figura 6** muestra la concentración de partículas (e8) con retinol (RA) y Nanocin™ en propilenglicol (PEG en las tablas o PG).

La **Figura 7** muestra los tamaños de partícula modales de retinol y Nanocin™ (en PEG en tablas o PG) después de 2 días a 4 °C con y sin calentamiento a 37 °C.

50 La **Figura 8** muestra la distribución de tamaño de partículas para retinol:Nanocin™ 1:5 en propilenglicol (PEG en las tablas o PG).

55 La **Figura 9** muestra la absorbancia cinética de nanopartículas de retinol disueltas en propilenglicol con diferentes concentraciones de Nanocin™ durante un almacenamiento de 24 h (línea roja: 10 mg/ml de retinol en solitario, línea azul: 10 mg/ml de retinol con 10 mg/ml de Nanocin™, línea verde: 10 mg/ml de retinol con 50 mg/ml de Nanocin™ y línea marrón: 10 mg/ml de retinol con 100 mg/ml de Nanocin™). Eje X: tiempo (s); Eje Y: absorbancia cinética (405 nm).

60 La **Figura 10** muestra una comparación entre la concentración de partículas tras incubación de una solución acuosa de Nanocin™ con vitamina C (en agua) (sin aceite ni TPGS) después de 3 horas o 4 días a 4 °C.

La **Figura 11** muestra concentraciones de partículas (menos sus valores de control) producidas después de 4 días a 4 °C con vitamina C y Nanocin™ en diferentes proporciones.

65 La **Figura 12** muestra la distribución de partículas modal de las nanopartículas después de incubación de vitamina C y Nanocin™ (en agua) durante 4 días a 4 °C.

La **Figura 13** muestra la distribución de tamaño de partícula para una mezcla vitamina C:Nanocin™ 1:5.

La **Figura 14** muestra los espectros de absorbancia de vitamina C (1 %) disuelta en agua sin Nanocin™ (línea roja) y con 1 % de Nanocin™ (línea roja) y 7 % de Nanocin™ (línea verde) después de 2 días de almacenamiento.

La **Figura 15** muestra los espectros de absorbancia de vitamina C (1 %) disuelta en agua sin Nanocin™ (línea roja) y con 1 % de Nanocin™ (línea roja) y 7 % de Nanocin™ (línea verde) después de 6 días de almacenamiento.

La **Figura 16** muestra la absorbancia cinética de vitamina C (1 %) disuelta en agua sin Nanocin™ (línea roja) y con concentraciones de 1 % de Nanocin™ (línea roja) y 7 % de Nanocin™ (línea verde) durante 6 días de almacenamiento.

La **Figura 17** muestra mediciones de DLS para las micelas de tocoferol con TPGS usando el método del Ejemplo 7.

La **Figura 18** muestra micelas de tocotrienol de acuerdo con el Ejemplo 7.

La **Figura 19** muestra la no formación de micelas que comprenden aceite de soja.

La **Figura 20** muestra TPGS al 5 % en retinol (lipófilo) con adición de Nanocin™ para formar micelas inversas.

La **Figura 21** muestra TPGS en retinol solo en micela inversa.

La **Figura 22** muestra retinol micelar (TPGS) sin Nanocin™ con ácido ascórbico al 5 % en una fase acuosa externa, pH bajo de aproximadamente 3.

La **Figura 23** muestra retinol micelar con TPGS e insulina en una fase acuosa externa.

La **Figura 24** muestra retinol micelar con TPGS y Nanocin™ y 200 UL de ácido ascórbico en una solución acuosa externa.

La **Figura 25** muestra retinol micelar con TPGS y Nanocin™ con 200 µl de insulina en una fase acuosa externa.

La **Figura 26** muestra mediciones para micelas de palmitato de ascorbilo con TPGS sin Nanocin. Para un 100 % de palmitato de ascorbilo como principio activo, no se observan micelas, solo precipitado. Para un 80 % de palmitato de ascorbilo y 20 % de retinol juntos en etanol, se mostraron los siguientes resultados, partículas más grandes y cierta turbidez, la eliminación del etanol produjo un precipitado.

La **Figura 27** muestra TPGS micelar-palmitato de ascorbilo con retinol 50:50 %.

La **Figura 28** muestra TPGS micelar con palmitato de ascorbilo al 10 % con un 90 % de retinol en una fase oleosa interna.

La **Figura 29** muestra micelas de TPGS con retinol a 0 días de almacenamiento.

La **Figura 31** muestra micelas de TPGS con retinol y Nanocin™ a 0 días de almacenamiento.

La **Figura 32** muestra micelas de TPGS con retinol y Nanocin™ al 2 % y después de 1 año.

La **Figura 33** muestra micelas de TPGS con retinol y Nanocin™ al 5 % y después de 1 año.

La **Figura 34** muestra micelas de TPGS con retinol y Nanocin™ al 10 % después de 1 año.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención reivindicada se define mediante las reivindicaciones. Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan para ilustrar la invención:

Ejemplo 1. Suspensión micelar de retinol (MicRet)

Se obtuvo una suspensión de retinol por el siguiente método:

1. Preparar una solución madre al 5 % de retinol en etanol (EtOH) añadiendo 1 g de retinol a 19 g de EtOH utilizando un agitador mecánico. Si el 5 % supera el límite de solubilidad, ajustar en consecuencia. De manera ideal, se debería obtener la concentración máxima de retinol en EtOH.

2. Preparar una solución madre al 10 % de vitamina E-TPGS en agua. Si el TPGS se suministra como solución acuosa al 20 %, entonces simplemente diluir. Si se suministra como material sólido, entonces añadir 10 g del TPGS a 90 g de H₂O. Siga las instrucciones de la ficha de datos para preparar una solución.

3. Medir el tamaño/la distribución de tamaños de las partículas.

4. Instalar un agitador magnético (o agitador de paletas) y una placa calefactora junto a una pequeña sonda/homogeneizador sónico. Introduzca 20 g de la solución madre de TPGS en el vaso de precipitados. Inicie una agitación bastante intensa. Aumente la temperatura a aproximadamente 50 °C, pero menos de 60 °C. Compruebe que el TPGS no "genera turbidez". No debería, pero si lo hace, reduzca la temperatura hasta que la solución esté transparente. Rápidamente, agregue 20 g de la solución madre de retinol con homogeneización y agitación constante y temperatura constante para "eliminar súbitamente" (evaporar) todo el EtOH. Si está disponible, esta etapa se puede mejorar aplicando vacío. Siga hasta que no queden trazas de EtOH. Enfríe rápidamente hasta 40 °C con agitación constante. Introducir en un frasco. Si es posible, almacenar bajo atmósfera de N₂. De lo contrario, llene el recipiente tanto como pueda. Tras retirar el EtOH, el retinol empezará a precipitar y, por tanto, debe llevarse inmediatamente a la suspensión micelar de TPGS.

5. Medir el tamaño/la distribución de tamaños de las partículas.

Para preparar retinol micelar con Nanocin™, se siguió el siguiente método adicional:

Preparación de la combinación MicRet:Nanocin™.

Etapas generales para preparar la combinación MicRet:Nanocin™:

- Pipetear el MicRet¹ adecuado en un tubo
- Añadir la cantidad apropiada de Nanocin² (solución al 20 %) y mezclar bien mediante pipeteo
- Añadir agua³ para compensar el volumen y mezcla bien mediante pipeteo

- 1 - mantener la misma cantidad de MicRet en diferentes combinaciones MicRet:Nanocin
- 2 - cantidad apropiada de Nanocin™ (20 %) para obtener la concentración requerida de Nanocin
- 3 - compensar el volumen para preparar la combinación MicRet:Nanocin™ con agua

Tabla 1. Ejemplo para preparar 10 ml de: MicRet:Nanocin al 10 %, MicRet:Nanocin™ al 5 % y MicRet:Nanocin™ al 2 %.

MicRet	Nanocin al 20 %	Agua (para compensar el volumen hasta 10 ml)	Combinación MicRet:Nanocin™ obtenida
5 ml	5 ml	0 ml	MicRet:Nanocin al 10 %
5 ml	2,5 ml	2,5 ml	MicRet:Nanocin al 5 %
5 ml	1 ml	4 ml	MicRet:Nanocin al 2 %

Los métodos anteriores mantienen el mismo nivel de MicRet en todas las combinaciones.

La composición micelar sin Nanocin™ así obtenida se analizó usando DLS (véase la **Figura 2B**) y se descubrió que era estable usando estabilidad de congelación/descongelación (véase la **Tabla 2**) durante un periodo de 3 días.

Asimismo, descubrió que las micelas que comprendían PHMB o Nanocin™ y TPGS tamponados, y retinol, eran igualmente estables y tenían un tamaño algo mayor de aproximadamente 30 nm en este caso (véase la **Figura 2**).

Estudio de estabilidad de MicRetinal + Nanocin al 2 %

Muestra	Diámetro (nm)	% Intensidad	% Masa	Cambio de color	Creosidad	Sólido congelado	Nota
Temperatura ambiente							
Muestra inicial de retinol	14,3	93,2	97,2	Normal	Ninguna	N/A	
Otro pico	801,9	6,8	2,8				
Muestra inicial con Nanocin al 2 %.	4,0	0,7	64,7	Normal	Ninguna	N/A	
Otro pico	32	99,3	35,3				
Primer periodo de 24 horas a (18 °C)							
Muestra de retinol	13,5	82,7	96,1	estable	Ninguna	No	Pequeña reducción de tamaño
	138,2	17,3	3,9				
Muestra con Nanocin al 2 %.	2,3	0,5	83,3	estable	Ninguna	No	Pequeña reducción de tamaño
	31,0	99,5	16,7				
2º periodo de 24 horas a (18 °C)							
Muestra de retinol	13,5	82,7	97,5	Algo más oscuro	Ninguna	No	
	138,2	17,3	2,5				
Muestra con Nanocin al 2 %.	2,3	0,5	84,0	estable	Ninguna	No	
	31,0	99,5	16,0				
3º periodo de 24 horas a (18 °C)							
Muestra de retinol	13,4	89,7	98,6	Estable a partir de la 2º	Ninguna	No	
	220,1	10,3	1,4				
Muestra con Nanocin al 2 %.	2,9	0,4	65,4	Algo más oscuro	Ninguna	Sí	Mismo lugar en el congelador cada vez
	30,0	99,6	34,6				

Tabla 2. Los resultados de congelación/descongelación durante 3 días para el retinol micelar con, y sin, Nanocin™.

Ejemplo 2. Método experimental y configuración de muestro utilizado para las evaluación NanoSight de las nanopartículas.

Nanocin™ se analizó con vitamina C en agua sin TPGS. Ambos compuestos se prepararon como soluciones madre de 1 mg/ml. Nanocin™ se precalentó a 60 °C durante 20 minutos, se sometió a vortización y, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se prepararon condiciones de incubación con diferentes proporciones de vitamina C:Nanocin™; 1:1, 1:3, 1:5 y 1:10 manteniendo la concentración de vitamina C a 5 µg/ml y la de Nanocin™ partiendo de 5 mg/ml aumentando a continuación hasta 15, 25 y 50 mg/ml con el aumento de la proporción.

Se preparó una solución de 2 ml añadiendo en primer lugar la vitamina C al agua, vortización, posterior adición del Nanocin™ final, seguido por batido subiendo y bajando la punta 10 veces. A continuación, la mezcla se dejó a 4 °C durante 4 días antes de realizar una medición en un instrumento Nanosight LM10. Se tomaron lecturas en determinadas condiciones operativas: nivel de cámara 16, umbral de detección 6 y ganancia de la pantalla 10.

Nanocin™ también se sometió a ensayo con retinol tanto en etanol (calidad para biología molecular) o propilenglicol (PEG es su acrónimo en las tablas siguientes o PG como abreviatura generalmente aceptada). Nanocin™ y retinol se prepararon como soluciones de 1 mg/ml tanto en propilenglicol como en etanol. Las soluciones de propilenglicol se calentaron a 37 °C durante 30 minutos con suave agitación para disolución. Las soluciones de retinol (en propilenglicol o etanol, 1 mg/ml) se almacenaron a -20 °C y se envolvieron con una hoja de aluminio para evitar su exposición a la luz.

Retinol:Nanocin™ tanto en propilenglicol como en etanol se combinaron en orden distinto en comparación con la combinación de vitamina C:Nanocin™. Para ambas soluciones en propilenglicol y etanol, se añadió Nanocin™ hasta el volumen de agua correcto en primer lugar, seguido de vortización, a continuación, el retinol se añadió en último lugar batiendo las disoluciones arriba y abajo 10 veces. Las soluciones de retinol y Nanocin™ se precalentaron a 37 °C antes de su adición para permitir la disolución. Se prepararon proporciones de retinol:Nanocin™ de 1:1, 1:3, 1:5 y 1:10 con retinol a una concentración final de 5 mg/ml y Nanocin™ aumentando para cada proporción desde 5, 15, 25 y 50 mg/ml. A continuación, las muestras se envolvieron con una hoja de aluminio a 4 °C durante 2 días antes de realizar una medición usando un instrumento Nanosight LM10. Se tomaron lecturas en determinadas condiciones operativas: nivel de cámara 13, umbral de detección 6 y ganancia de la pantalla 10. Las proporciones experimentales se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Muestras experimentales

	Vitamina C: Nanocin™	Volumen de vitamina C (µl)	Volumen de Nanocin™ (µl)	Volumen de agua (µl)
5	1:1	10	10	1980
	1:3	10	30	1960
	1:5	10	50	1940
	1:10	10	100	1890
10	5 µg/ml de Vitamina C	10	0	1990
	5 µg/ml de Nanocin™	0	10	1990
	15 µg/ml de Nanocin™	0	30	1970
15	25 µg/ml de Nanocin™	0	50	1950
	50 µg/ml de Nanocin™	0	100	1800
	Retinol:Nanocin™ (en etanol)	Volumen de retinol (µl)	Volumen de Nanocin™ (µl)	Volumen de agua (µl)
20	1:1	10	10	1980
	1:3	10	30	1960
	1:5	10	50	1940
	1:10	10	100	1890
25	5 µg/ml de Retinol	10	0	1990
	5 µg/ml de Nanocin™	0	10	1990
	15 µg/ml de Nanocin™	0	30	1970
30	25 µg/ml de Nanocin™	0	50	1950
	50 µg/ml de Nanocin™	0	100	1800
	Retinol:Nanocin™ (en PROPILENGLICOL)	Volumen de retinol (µl)	Volumen de Nanocin™ (µl)	Volumen de agua (µl)
35	1:1	10	10	1980
	1:3	10	30	1960
	1:5	10	50	1940
	1:10	10	100	1890
40	5 µg/ml de retinol	10	0	1990
	5 µg/ml de Nanocin™	0	10	1990
	15 µg/ml de Nanocin™	0	30	1970
45	25 µg/ml de Nanocin™	0	50	1950
	50 µg/ml de Nanocin™	0	100	1800

Ejemplo 3. Formulación de partículas de retinol con Nanocin™

Objetivo 1: formular partículas de retinol con Nanocin™.

El *Objetivo 1* se alcanzó usando disolventes alternativo y también usando una formulación nanomicelar con TPGS. Los disolventes alternativos se detallan a continuación:

A) Agua

Todos los intentos de disolver retinol en agua fueron infructuosos, salvo cuando se utilizó una formulación micelar con TPGS, según el método descrito en el Ejemplo 1.

B) Etanol

El retinol se disolvió en etanol absoluto a una concentración de 10 mg/ml con Nanocin™ añadido a las concentraciones indicadas en las tablas 4-9 siguientes. Se usaron dos técnicas para evaluar la creación de nanopartículas; observación visual directa al microscopio de fluorescencia y detección de no imágenes mediante dispersión de luz dinámica (DLS), usando un instrumento Malvern Zetasizer. La observación con un microscopio de fluorescencia (excitación: 335 nm, emisión: 458 nm) mostró pequeños puntos iluminados, que se desvanecían rápidamente (no se muestra). Esto establece

la formación y presencia de partículas de retinol y Nanocin™. El retinol muestra fluorescencia con una longitud de onda de emisión de 458 nm. Usando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) (Malvern Zetasizer), se pudo determinar el tamaño real de las partículas de retinol disueltas en etanol absoluto con diferentes concentraciones de Nanocin™. DLS es una técnica bien establecida usada en el análisis de partículas de tamaño submicrométrico. 10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto) en solitario tiene un tamaño promedio de 396,5 nm, y esto aumenta tras la adición de diferentes concentraciones de Nanocin™, lo que indica la creación de partículas (véase la **Figura 2** y la **Tabla 4**).

Tabla 4. El tamaño promedio de las partículas de retinol disuelto en etanol absoluto con concentraciones individuales de Nanocin™ determinado con DLS

Muestra	Tamaño promedio [d.nm]	Desviación estándar
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 0 mg/ml Nanocin™	396,5	7,99
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 10 mg/ml Nanocin™	888,7	72,72
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 100 mg/ml Nanocin™	1437,0	68,97

C) Propilenglicol

El retinol se disolvió en propilenglicol a una concentración de 10 mg/ml. La presencia de partículas de retinol disuelto en propilenglicol con Nanocin™ (vistas como partículas fluorescentes) se determinó por observación al microscopio de fluorescencia.

La observación bajo un microscopio de fluorescencia (excitación: 335 nm, emisión: 458 nm) mostró la presencia de pequeños puntos iluminados, que se desvanecían rápidamente (no se muestra). Esto indicó la formación de partículas de retinol y Nanocin™. El retinol muestra fluorescencia con una longitud de onda de emisión de 458 nm.

Desafortunadamente, el tamaño exacto de las partículas de retinol disueltas en propilenglicol (PEG) con diferentes concentraciones de Nanocin™ no se pudo determinar de forma reproducible usando DLS (Malvern Zetasizer) debido a la elevada polidispersidad de la suspensión de partículas.

D) Solución micelar de retinol al 5 % con TPGS y Nanocin

También se usó una solución micelar de retinol al 5 % con diferentes concentraciones de Nanocin™. Como se ha descrito anteriormente, se usó la observación visual (microscopio de fluorescencia) para determinar si se habían creado partículas. De nuevo, se usó DLS (Malvern Zetasizer) para determinar la distribución del tamaño de las partículas.

La observación bajo el microscopio de fluorescencia (excitación: 335 nm, emisión: 458 nm) no mostró la presencia de partículas. Sin embargo, esto no impide la creación de partículas, ya que las partículas pueden ser demasiado pequeñas como para apreciarse por este método (véase más adelante).

La detección por DLS usando un instrumento Malvern Zetasizer claramente reveló la formación de nanopartículas. La solución micelar de retinol al 5 % en solitario tenía un tamaño promedio de nanopartícula de 13,08 nm que aumentó con la adición de varias concentraciones de Nanocin™, (véase la **Figura 4** y la **Tabla 5**).

Tabla 5. El tamaño promedio de las nanopartículas de una solución micelar de retinol al 5 % con diferentes concentraciones de Nanocin™.

Muestra	Tamaño promedio [d.nm]	Desviación estándar
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 0 %	13,08	0,12
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 2 %	14,12	0,07
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 5 %	16,61	0,16
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 10 %	19,57	0,28

Ejemplo 4. Determinación de la estabilidad de las partículas de retinol y Nanocin™

Objetivo 2: determinar la estabilidad y la capacidad para administrar vitaminas de las partículas formuladas.

El **Objetivo 2** se consiguió. Se generaron partículas de retinol y Nanocin™ estables.

La estabilidad de las partículas formuladas se confirmó siguiendo la absorbancia en función del tiempo de almacenamiento.

A) Agua

Retinol. No se iniciaron investigaciones según el *Objetivo 2* puesto que el retinol es insoluble en agua.

B) Etanol

A diferencia de la muestra de control de ácido retinoico en propilenglicol (PEG), la muestra de control de retinol en etanol no mostró un nivel elevado de partículas, sin embargo, las muestras se midieron sin calentar y a 37 °C. **Figura 3** muestra una comparación de la concentración de partículas para la incubación de retinol y Nanocin™ (en etanol) después de 2 días a 4 °C con, o sin, calentamiento a 37 °C, antes de la lectura. Los tamaños de partícula para la combinación Retinol:Nanocin™ estuvieron comprendidas en 104 nm -130 nm (calentadas a 37 °C) o 103 nm -113 nm sin calentar. Los perfiles de distribución de los tamaños de partícula con las diferentes proporciones fueron muy similares (véase a continuación). La **Figura 4** muestra la distribución de tamaño de partícula para Retinol: Nanocin™ 1:3 en etanol.

Las soluciones de 10 mg/ml de retinol en etanol absoluto con diferentes concentraciones de Nanocin™ se almacenaron durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. La solución también se protegió de la degradación introduciéndola en viales de vidrio color ámbar y almacenándola en la oscuridad. Para evaluar la estabilidad de las partículas, se llevó a cabo la medición de la absorbancia con una longitud de onda de 405 nm después de la preparación inicial a las 0 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento. Las mediciones de la absorbancia cinética (para una longitud de onda de 405 nm) de las partículas de retinol disueltas en etanol absoluto con diferentes concentraciones de Nanocin™ (10 mg/ml de retinol en solitario, con 10 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml de Nanocin™) también se midieron durante el tiempo de almacenamiento de 24 (véanse la **Tabla 6** y la **Figura 5**).

Tabla 6. La absorbancia del retinol disuelto en etanol absoluto con concentraciones individuales de Nanocin™ a tiempo cero (0 h) y después de 24 h de almacenamiento.

Muestra	A ₄₀₅ 0 h	A ₄₀₅ 24 h
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 0 mg/ml Nanocin™	1,79	2,66
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 10 mg/ml Nanocin™	1,58	2,73
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 50 mg/ml Nanocin™	1,62	3,36
10 mg/ml de retinol (en etanol absoluto): 100 mg/ml Nanocin™	1,72	2,86

En resumen, después de 2 días de incubación a 4 °C con retinol y Nanocin™ en etanol, todas las proporciones analizadas produjeron importantes aumentos en las concentraciones de partículas, en comparación con las muestras de control. Con calentamiento, las concentraciones disminuyeron, pero siguieron siendo mayores que los valores del control, donde la proporción 1:3 produjo la mayor concentración de nanopartículas formada. Las partículas fueron estables en la solución/suspensión y se observó una pequeña estabilización química.

C) Propilenglicol

Después de 2 días de incubación a 4 °C, los resultados iniciales mostraron que el control de retinol (al 0,5 % en propilenglicol) produjo una elevada concentración de partículas, de manera que las muestras se calentaron a continuación a 37 °C durante 30 minutos con agitación suave para disolver todas las partículas y los resultados se compararon como valores sin calentar y calentados a 37 °C, como se muestra en la **Figura 6**.

Se produjo una notable disminución en la concentración de partículas en el retinol de control después del calentamiento; todos los controles de Nanocin™ tuvieron muy pocas o ninguna partícula presente. Todas las combinaciones de ácido retinoico: Nanocin™ mostraron un aumento significativo en las concentraciones de partículas en comparación con los controles, que disminuyeron ligeramente después del calentamiento. Los tamaños de partícula modales de retinol y Nanocin™ (en propilenglicol (PEG o PG)) se midieron después de 2 días a 4 °C con y sin calentamiento a 37 °C antes de la lectura (**Figura 7**). Típicamente, el tamaño de partícula promedio para las muestras calentadas de Retinol:Nanocin™ sin TPGS estuvo comprendido entre 115 nm-121 nm con una anchura de distribución del tamaño constante. La **Figura 8** muestra la distribución de tamaño de partículas para retinol:Nanocin™ 1:5 en propilenglicol (PEG o PG) sin TPGS.

Las soluciones de 10 mg/ml de retinol en propilenglicol (PEG) con diferentes concentraciones de Nanocin™ se almacenaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Las soluciones también se protegieron contra la potencial degradación almacenando los viales de vidrio de color ámbar en la oscuridad. Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas, se llevó a cabo la medición de la absorbancia con una longitud de onda de 405 nm a las 0 h de almacenamiento y después de 24 h de almacenamiento. La absorbancia cinética de las partículas de retinol disueltas en propilenglicol con diferentes concentraciones de Nanocin™ (10 mg/ml de retinol en solitario, con 10 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml Nanocin™) también se midió (medición de la absorbancia con una longitud de onda de 405 nm) durante 24 h de tiempo de almacenamiento (véase la **Tabla 7** y la **Figura 9**).

Tabla 7. La absorbancia del retinol disuelto en propilenglicol con concentraciones individuales de Nanocin™ a 0 h y después de 24 h de almacenamiento.

Muestra	A ₄₀₅ 0 h	A ₄₀₅ 24 h
10 mg/ml de retinol (propilenglicol): 0 mg/ml Nanocin™	2,37	3,31
10 mg/ml de retinol (propilenglicol): 10 mg/ml Nanocin™	2,47	2,37
10 mg/ml de retinol (propilenglicol): 50 mg/ml Nanocin™	2,66	2,58
10 mg/ml de retinol (propilenglicol): 100 mg/ml Nanocin™	2,61	2,63

En resumen, después de 2 días de incubación a 4 °C con retinol y Nanocin™ en propilenglicol (PEG) dio como resultado un notable aumento en las concentraciones de partículas tras la combinación, en comparación con los controles. Todas las proporciones de combinación mostraron niveles similares de concentraciones de partículas, siendo la de 1:5 (Retinol: Nanocin™) la que proporcionó el mayor nivel de concentración. La variación en los tamaños de partículas fue muy similar entre todas las proporciones y estuvo comprendida entre 115 nm -121 nm. Las partículas fueron estables en la solución/suspensión y se observó una pequeña estabilización química en ciertas condiciones.

D) Solución micelar de retinol al 5 % con TPGS (Método del Ejemplo 1).

Soluciones micelares de retinol al 5 % con diferentes concentraciones (0 %, 2 %, 5 %, 10 %) de Nanocin™ se almacenaron durante 5 días a temperatura ambiente en la oscuridad. Para evaluar la estabilidad de las partículas, se llevaron a cabo mediciones de la absorbancia con una longitud de onda de 405 nm tras la preparación inicial a 0 días de almacenamiento y después de 5 días de almacenamiento (véase la **Tabla 8**)

Tabla 8. La absorbancia de las partículas de la solución micelar de retinol al 5 % con las concentraciones individuales de Nanocin™ a tiempo cero (0 días) y después de 5 días de almacenamiento.

Muestra	A ₄₀₅ 0 día	A ₄₀₅ 5 días
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 0 %	4,11	4,18
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 2 %	4,05	4,40
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 5 %	4,04	4,51
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 10 %	4,14	4,19

Para evaluar la estabilidad de las partículas, soluciones de partículas se centrifugaron el quinto día de almacenamiento y se llevó a cabo la medición de la absorbancia a 405 nm antes y después de la centrifugación (véase la **Tabla 9**).

Tabla 9. La absorbancia de las partículas de la solución micelar de retinol al 5 % con las concentraciones individuales de Nanocin™ en el día de almacenamiento 5, antes y después de la centrifugación.

Muestra	A ₄₀₅ Antes de la centrifugación	A ₄₀₅ Después de la centrifugación
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 0 %	4,18	4,50
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 2 %	4,40	4,47
Solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 5 %	4,51	4,38
solución micelar de retinol al 5 %: Nanocin™ al 10 %	4,19	4,34

Estudio de estabilidad de MicRetinal + Nanocin al 2 %

Muestra	Diámetro (nm)	% Intensidad	% Masa	Cambio de color	Cremosidad	Sólido congelado	Nota
5	Temperatura ambiente						
Muestra inicial de retinol	14,3	93,2	97,2	Normal	Ninguna	N/A	
Otro pico	801,9	6,8	2,8				
10	Muestra inicial con Nanocin al 2 %.						
Muestra inicial con Nanocin al 2 %.	4,0	0,7	64,7	Normal	Ninguna	N/A	
Otro pico	32	99,3	35,3				
Primer periodo de 24 horas a (18 °C)							
Muestra de retinol	13,4	88,9	96,1	estable	Ninguna	No	Pequeña reducción de tamaño
	683,1	11,1	3,9				
15	Muestra con Nanocin al 2 %.						
Muestra con Nanocin al 2 %.	2,6	0,5	83,3	estable	Ninguna	No	Pequeña reducción de tamaño
	30,5	99,5	16,7				
2º periodo de 24 horas a (18 °C)							
Muestra de retinol	13,5	82,7	97,5	Algo más oscuro	Ninguna	No	
	138,2	17,3	2,5				
20	Muestra con Nanocin al 2 %.						
Muestra con Nanocin al 2 %.	2,3	0,5	84,0	estable	Ninguna	No	
	31,0	99,5	16,0				
3º periodo de 24 horas a (18 °C)							
Muestra de retinol	13,4	89,7	98,6	Estable a partir de la 2º	Ninguna	No	
	220,1	10,3	1,4				
30	Muestra con Nanocin al 2 %.						
Muestra con Nanocin al 2 %.	2,9	0,4	65,4	Algo más oscuro	Ninguna	Sí	Mismo lugar en el congelador cada vez
	30,0	99,6	34,6				

Tabla 10. Ciclo de 3 días de congelación para el retinol micelar en TPGS, con y sin Nanocin.**Ejemplo 5. Formulación de partículas de vitamina C con Nanocin™****Objetivo 1:** formular nanopartículas de vitamina C con Nanocin™, sin TPGS**Objetivo 2:** determinar la estabilidad y la capacidad para administrar vitaminas de las nanopartículas formuladas.

Nanocin™ se incubó con vitamina C (en agua) (sin aceite ni TPGS) y se determinaron las cantidades de partículas después de 3 horas y también 4 días a 4 °C. Después de 3 horas de incubación, hubo poca diferencia en las cantidades de partículas, por lo que las incubaciones se dejaron a 4 °C durante 4 días (**Figura 10**).

No se formaron micelas, sino un 'nido' de PHMB tamponado en agua, la carga no es elevada. Solo hubo un único ejemplo (**Figura 13**) de una partícula menor de 100 nm, 70 nm, la forma de la gráfica es amplia, lo que significa que no hay partículas diferenciadas como tal, sino de nuevo, la carga no es elevada y no hay micelas.

Una vez que los valores de control se restaron de los valores de la combinación de vitamina C:Nanocin™, se mostró que no se habían producido nanopartículas a la proporción de 1:1 pero que se habían creado a las proporciones de 1:3 y 1:5 y menos a la proporción 1:10. La proporción 1:5 de vitamina C:Nanocin™ produjo tanto la mayor concentración de partículas (**Figura 11**), como los tamaños de partícula más pequeños (**Figura 12**). La distribución del tamaño de partículas para la mezcla de vitamina C:Nanocin™ 1:5 se muestra en la **Figura 13**.

Las soluciones de vitamina C en agua con diferentes concentraciones de Nanocin™ se almacenaron a 50 °C durante 6 días. Se realizó una medición de la absorbancia con diferentes longitudes de onda (350 nm - 700 nm) cada 24 horas hasta 6 días de incubación (véase la **Figura 14** y **Figura 15**). Se llevó a cabo la medición de la absorbancia cinética con una longitud de onda de 405 nm a las 24 h de almacenamiento y después de 6 días de almacenamiento (véase la **Figura 16**).

En resumen, después de 4 días de incubación a 4 °C con vitamina C, la proporción que daba el mayor número de nanopartículas fue 1:5 (vitamina C:Nanocin™), con un tamaño de partícula modal de 70 nm (**Figura 12**). La proporción de 1:5 dio como resultado aproximadamente 2,5 veces más partículas que la proporción 1:3 y 7 veces más que la proporción 1:10. La proporción 1:1 no produjo ninguna partícula. Se observó una pequeña estabilización química.

Ejemplo 6. Formulación de nanopartículas micelares de retinol y palmitato de ascorbilo con TPGS y sin Nanocin™ ni PHMB

En determinadas aplicaciones, puede ser deseable incorporar más de un agente bioactivo a la composición micelar.

5 Por tanto, la composición micelar puede comprender retinol y palmitato de ascorbilo. Cuando la composición micelar comprende retinol y palmitato de ascorbilo, la cantidad de retinol estará en el intervalo de 30 a 99,9 de la de palmitato de ascorbilo.

El método se llevó a cabo como en el Ejemplo 1.

10 a) Retinol y palmitato de ascorbilo se disolvieron en un disolvente orgánico (etanol) para proporcionar una fase hidrófoba;
b) la fase hidrófoba se añadió a una solución acuosa de TPGS; y
c) una porción del disolvente orgánico se eliminó mediante (¿una combinación de calentamiento/vacío?).

15 Se descubrió que sustituir totalmente el retinol por palmitato de ascorbilo en el método micelar descrito en el Ejemplo 1 proporciona un precipitado turbio (sin formación de micelas).

20 A una proporción 20:80 de retinol:palmitato de ascorbilo, se eliminó material más grande notablemente por encima del tamaño de nanopartículas (100 nm) (se midió el DLS antes de la eliminación del etanol) y se eliminó un gel turbio cuando el etanol se eliminó (véase la **Figura 26**).

A una proporción 50:50 de retinol:palmitato de ascorbilo, se midieron pequeñas micelas (**Figura 27**).

25 A una proporción 90:10 de retinol:palmitato de ascorbilo, se midieron pequeñas micelas (véase la **Figura 28**).

Ejemplo 7. Formulación de nanopartículas micelares de tocoferol y tocotrienol con TPGS y sin Nanocin

El método se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 sustituyendo el retinol por tocotrienol.

30 La formulación de micelas se usó para formar micelas con tocoferol, tocotrienol y aceite de soja. Los resultados de las mediciones por DLS mostradas a continuación muestran mediciones de tamaño nanométrico para el tocoferol, tocotrienol. Los resultados para el aceite de soja son mayores.

35 Tanto los líquidos de tocoferol como de tocotrienol eran transparentes cuando se calentaron a 40 °C pero tras el enfriamiento se formó algo de precipitado que se eliminó por filtración y, a continuación, ambos materiales líquidos quedaron transparentes. Calentar el aceite de soja a 40 °C dio como resultado gran cantidad de precipitado que se eliminó por filtración, pero el líquido siguió turbio a todas las temperaturas (sin micelas).

40 Los resultados de las micelas de tocoferol con TPGS usando el método del Ejemplo 7 se detallan en la **Figura 17**. El panel B de la Figura 17 muestra un pico a 100 nm que no se observa en la Figura 17 D, pero es una cantidad pequeña de partículas más grandes que se puede descartar para el tocoferol.

Los resultados de las micelas de tocotrienol de acuerdo con el Ejemplo 7 se detallan a continuación y en la **Figura 18**.

45 Los resultados para el aceite de soja se detallan a continuación y en la **Figura 19**.

Se realizaron mediciones DLS completas usando un analizador de partículas submicrométricas Beckman Coulter a 20 °C.

Ejemplo 8: Formación de micelas inversa

50 El método de las Figuras 20-21 es el siguiente: el retinol se disolvió con etanol y, a continuación se añadió TPGS al 10 % p/p y ambos se calentaron, a continuación, el etanol se eliminó usando calentamiento o sonicación o ambos formando una primera solución. Nanocin al 5 % como segunda solución se añadió a continuación a la primera solución para formar micelas inversas. La Figura 20 muestra la primera solución formada con TPGS al 10 % en retinol.

55 La **Figura 20** muestra TPGS al 10 % en retinol (lipófilo) con adición de Nanocin™ para formar micelas inversas.

La **Figura 21** muestra TPGS al 10 % en retinol solo en micela inversa.

60 Las **Figuras 22-25** se basan en el ejemplo y método del Ejemplo 1 donde se ha añadido Nanocin a MicRet, en este caso, Nanocin ha sustituido o se ha combinado con ácido ascórbico o insulina.

La **Figura 22** muestra retinol micelar (TPGS) sin Nanocin™ con ácido ascórbico al 5 % en una fase acuosa externa, pH bajo de aproximadamente 3.

65 La **Figura 23** muestra retinol micelar con TPGS e insulina en una fase acuosa externa.

La **Figura 24** muestra retinol micelar con TPGS y Nanocin™ y 200 UL de ácido ascórbico en una solución acuosa externa.

La **Figura 25** muestra retinol micelar con TPGS y Nanocin™ con 200 µL de insulina en una fase acuosa externa.

5

Ejemplo 9: Estabilidad de las nanopartículas con el tiempo

La estabilidad a largo plazo de las micelas se evaluó en 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente en la oscuridad. Soluciones micelares de retinol en TPGS con diferentes concentraciones (0 %, 2 %, 5 %, 10 %) de Nanocin™ se almacenaron durante 1 año a temperatura ambiente en la oscuridad. Para evaluar la estabilidad de las partículas, se llevó a cabo la medición de la absorbancia con una longitud de onda de 405 nm después de la preparación inicial a los 0 días de almacenamiento y después de 1 año a temperatura ambiente en la oscuridad. Las micelas permanecieron estables después de un año de almacenamiento a temperatura ambiente, con y sin Nanocin™ (véanse las Figuras 29 a 34).

10

15 **Ejemplo 10: Resumen**

Los anteriores ejemplos demuestran que las partículas fabricadas sin TPGS tienen más de 100 nm y menor carga y que no todos los principios activos o ingredientes liposolubles funcionan bien en los métodos detallados.

20

Las mediciones muestran micelas de retinol y TPGS que son pequeñas, estables y demuestran buena carga. La adición de Nanocin™ a estas micelas proporciona nanopartículas notablemente más pequeñas, de mayor estabilidad y mayor carga que con Nanocin™ usado sin TPGS.

25

Tocoferol y tocotrienol proporcionan nanomicelas. El palmitato de ascorbilo necesita retinol para formar micelas. Las micelas de tocoferol y tocotrienol no se prepararon usando Nanocin™ con TPGS, pero el éxito de la adición de Nanocin™ a las micelas de TPGS de palmitato de ascorbilo y retinol indica que la adición de Nanocin™ hubiera tenido un efecto drástico similar sobre el tocoferol y el tocotrienol.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende micelas de succinato de d- α -tocoferilo polietilenglicol 1000 (TPGS) acuoso, polihexametilenbiguanida (PHMB) o PHMB tamponada y un agente bioactivo terapéutico; en donde las micelas de la composición no superan los 31 nm.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde el agente bioactivo terapéutico es un principio activo liposoluble.
- 10 3. La composición de la reivindicación 2, en donde el principio activo liposoluble es una vitamina aromática liposoluble, preferiblemente retinol, tocotrienol y/o tocoferol.
4. La composición según la reivindicación 3, en donde el principio activo liposoluble es retinol.
- 15 5. La composición de la reivindicación 4, en donde la composición además comprende palmitato de ascorbilo.
6. La composición de la reivindicación 5, en donde la relación entre el retinol y el palmitato de ascorbilo puede ser 50:50.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las micelas no superan los 25 nm.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en donde las micelas no superan los 20 nm.
9. La composición según la reivindicación 1, en donde el TPGS acuoso comprende además un agente hidrosoluble.
- 25 10. La composición de la reivindicación 9, en donde el agente hidrosoluble comprende un principio activo hidrosoluble tal como insulina, ácido ascórbico o ácido L-ascórbico.
11. La composición de la reivindicación 10, en donde el agente hidrosoluble comprende insulina.
- 30 12. Una formulación cosmética que comprende la composición que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. La formulación cosmética de la reivindicación 12, en donde la composición de micelas está en forma de una crema, loción, gel, semisólido, dispersión, suspensión, espuma, mousse o pulverización.

Figura 1

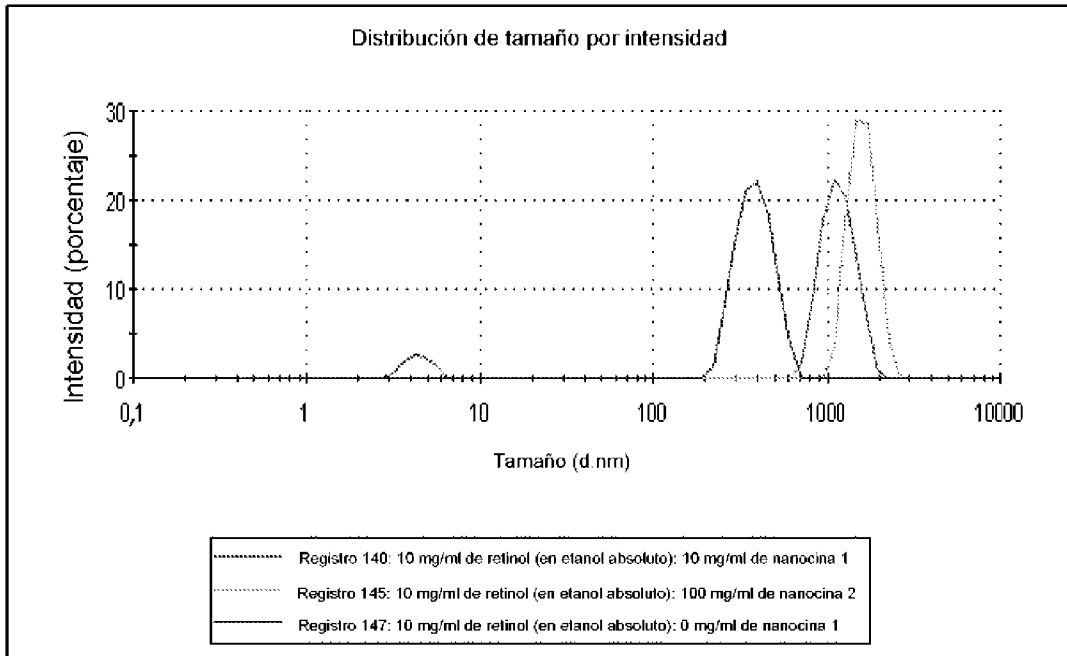


Figura 2A: Micelas con TPGS, retinol y nanocin™ mostrando tamaño nanométrico

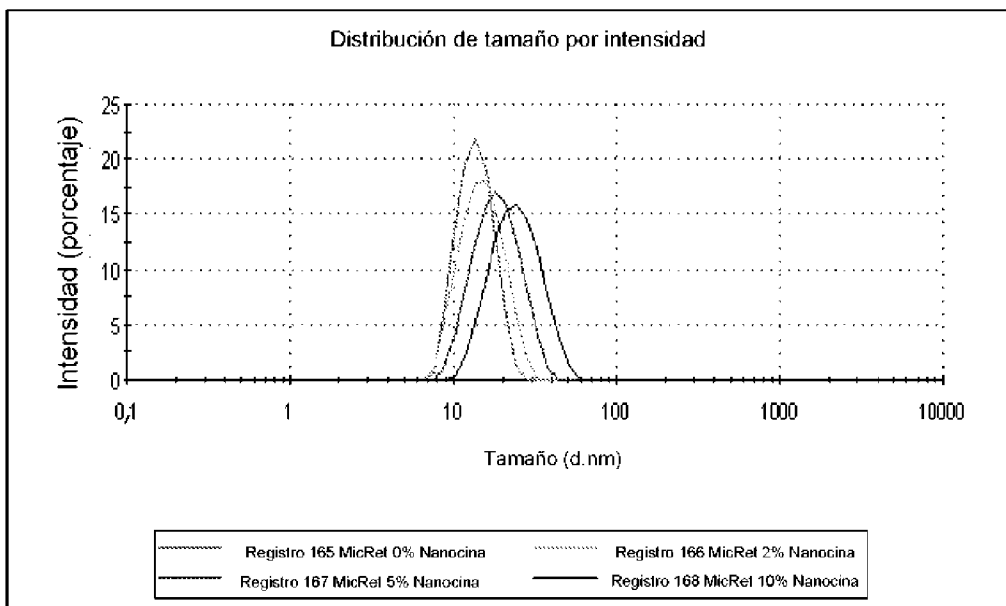


Figura 2B

Instrumento

Número de serie	3147-DMP
Modelo	DeisaMax Pro
Versión Firmware Pais	1.0.1.11
Versión Firmware DLS	1.1.2.0
Versión Firmware Assist	1.0.0.9
Nombre del instrumento	169.254.83.4
Longitud de onda del láser	532,2
Tiene DLS	Sí
Temperatura mínima (C)	3,5
Temperatura mínima sin N2 (C)	20
Temperatura máxima (C)	70
Velocidad de rampa mínima (C/min)	0
Velocidad de rampa máxima (C/min)	1,5

Fijado

Filtro en tiempo real	Sí
Función de correlación corte inferior (μs)	1,5
Función de correlación corte superior (μs)	60.000
Autoescalado en el canal	0
Tiempo de retardo mínimo mostrado (μs)	0,5
Corte inferior del radio del pico (nm)	0,5
Corte superior del radio del pico (nm)	10.000
Tipo de análisis	Dynals
Factor límite de tiempo de medición	5
Calcular D10/D50/D90	No
Calcular polidispersidad	Sí
Análisis dependencia temperatura	No

Disolventes

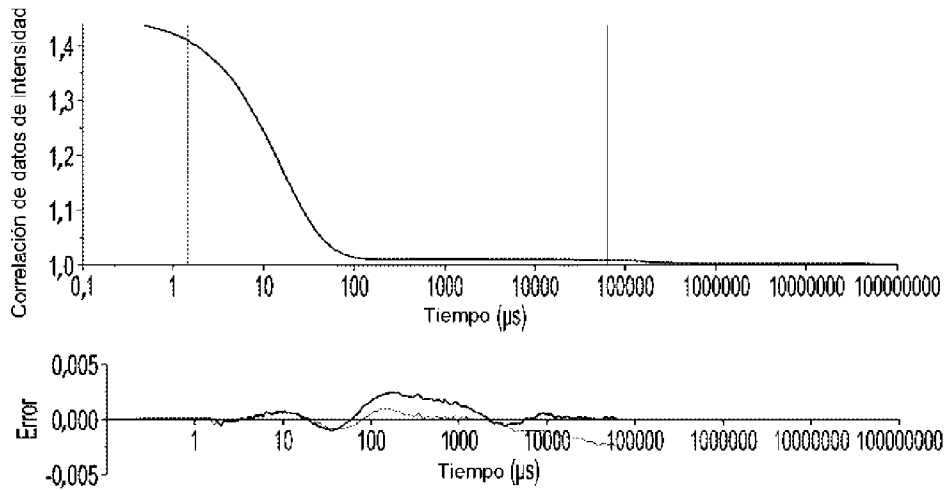
	Rfr idx a 689nm y 20C	Modelo Temp	Viscosidad (CP)	Viscosidad Temp. (C)	Modelo constante dieléctrica	Constante dieléctrica
Agua	1,333	Acuoso	1,019	20,0	Fijo	80,0

Tabla de registro de datos: retinol micelar retinol

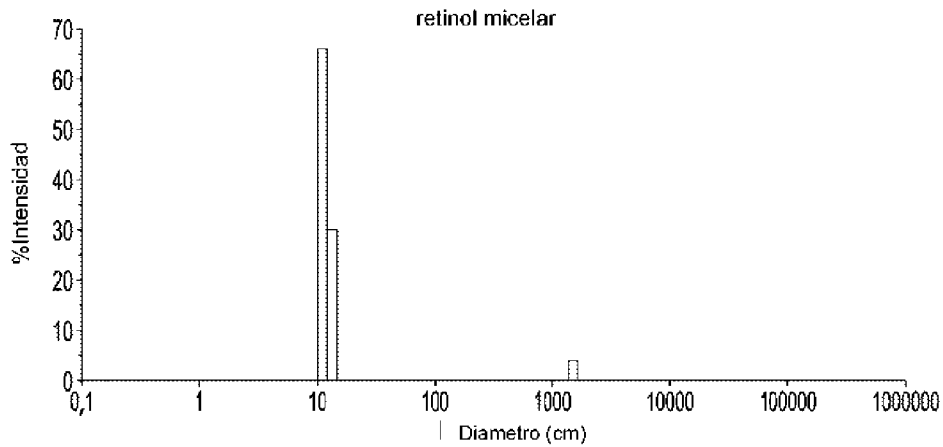
	Elemento	Diámetro (nm)	Índice PD	% intensidad pico (I)	% Masa pico (I)	Diámetro pico (I)
1	Retinol micelar	12,2	0,195	96,31	98,58	11,02
Media		12,2	0,195	96,31	98,58	11,02
S		0,0	0,000	0,00	0,00	0,00
%S		0,0	0,000	0,00	0,00	0,00
S ²		0,0	0,000	0,00	0,00	0,00
Min.		12,2	0,195	96,31	98,58	11,02
Máx.		12,2	0,195	96,31	98,58	11,02

Figura 2C

Función de correlación: retinol micelar



Resultados de regularización: retinol micelar



	Diametro (nm)	Índice Pd	%Intensidad	% Masa
Pico 1	11,0	0,01	96,3	98,6
Pico 2	1491,9	0,00	3,7	1,4

Figura 3

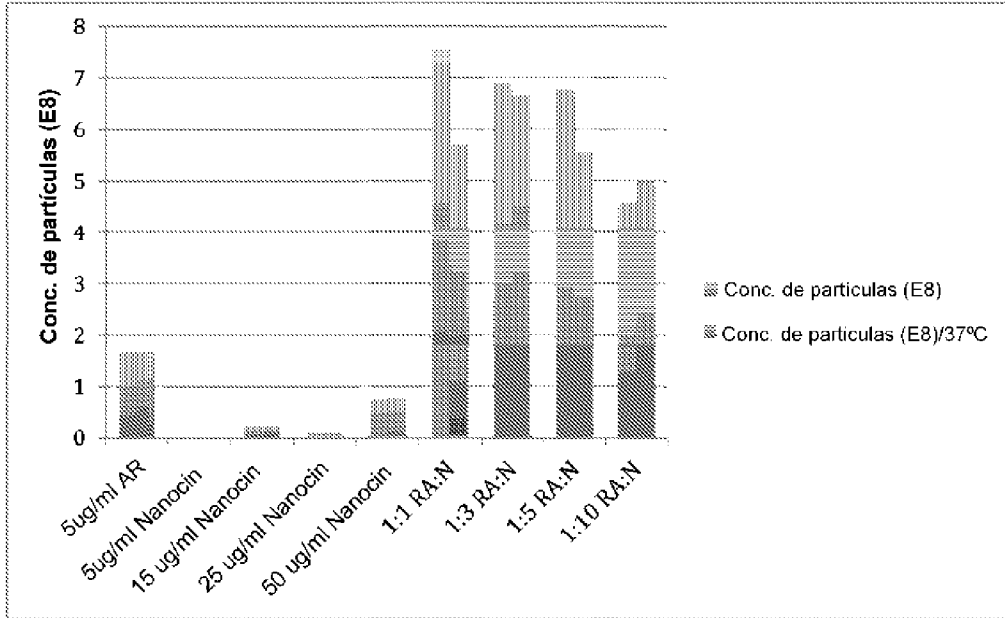


Figura 4 que muestra un tamaño de partícula superior a 100 nm sin TPGS

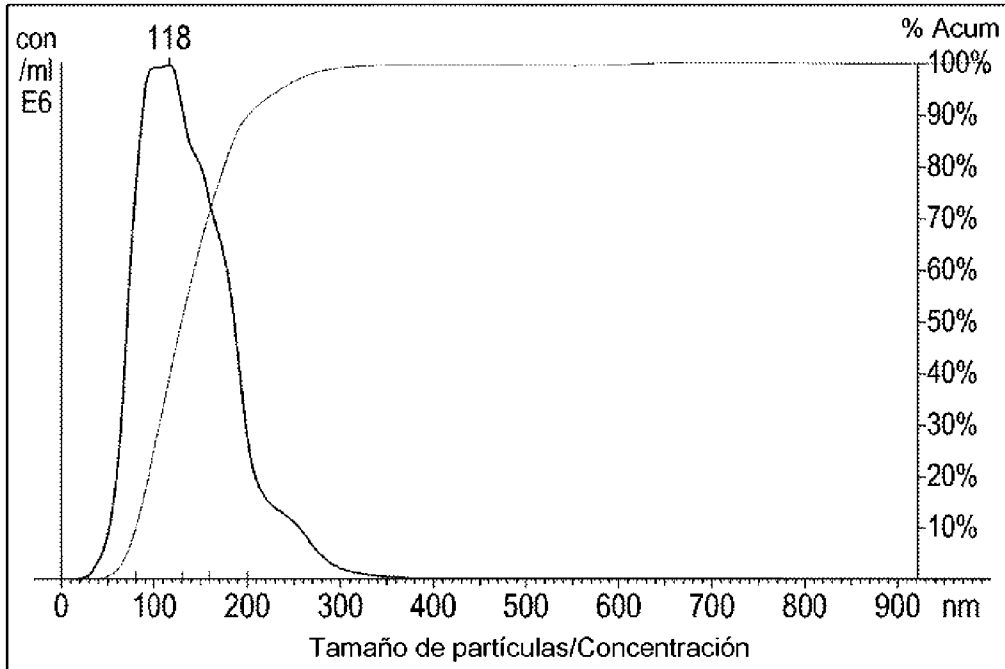


Figura 5

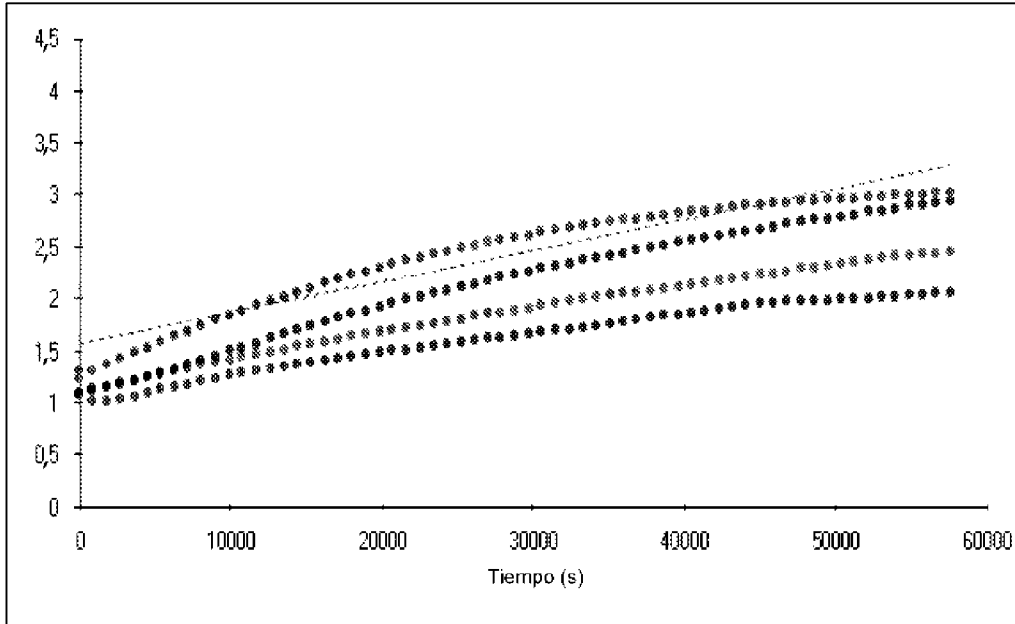


Figura 6

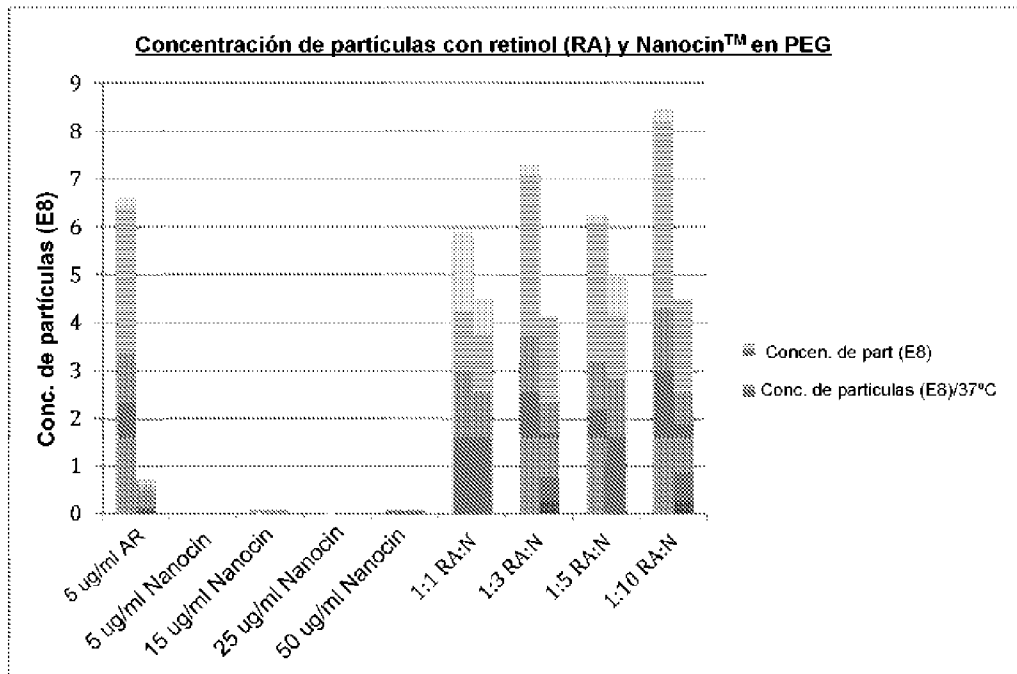
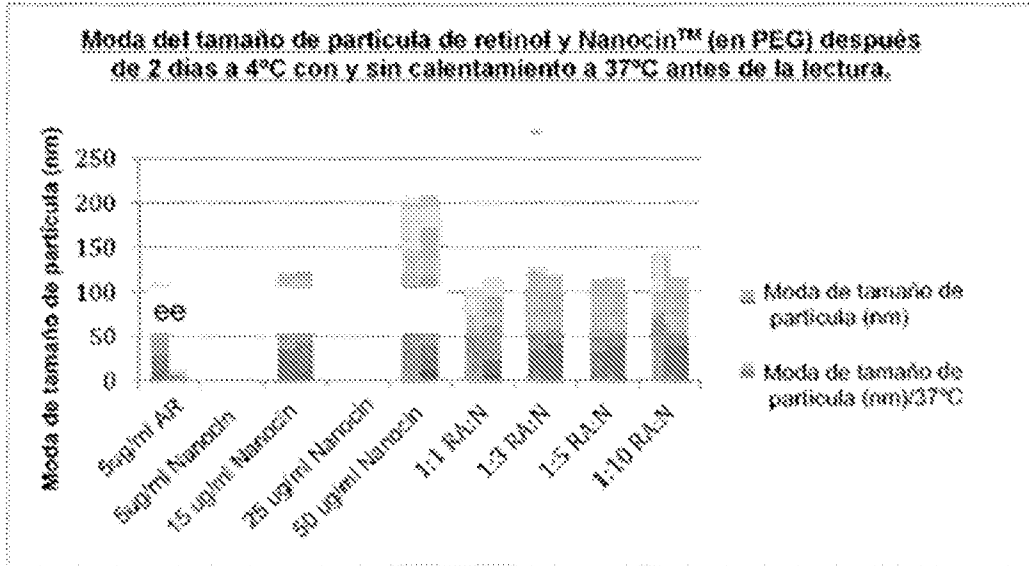


Figura 7



La Figura 8 muestra nuevamente un tamaño de partícula superior a 100 nm sin TPG5

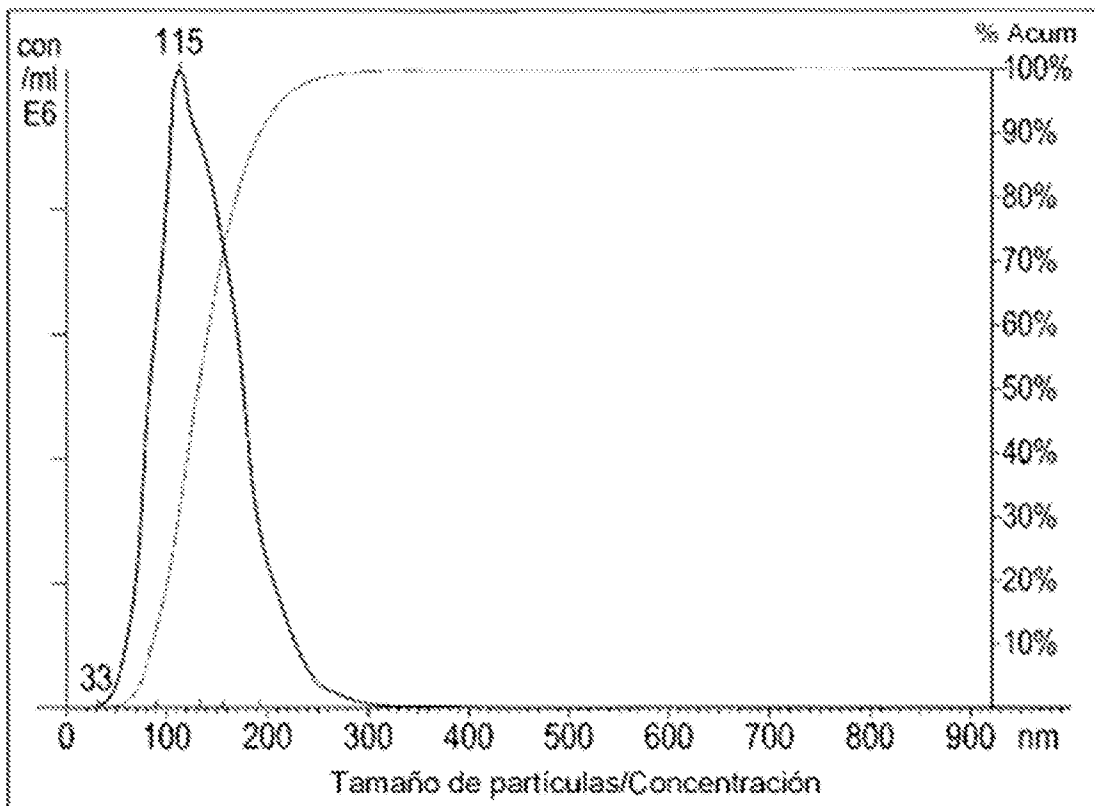


Figura 9

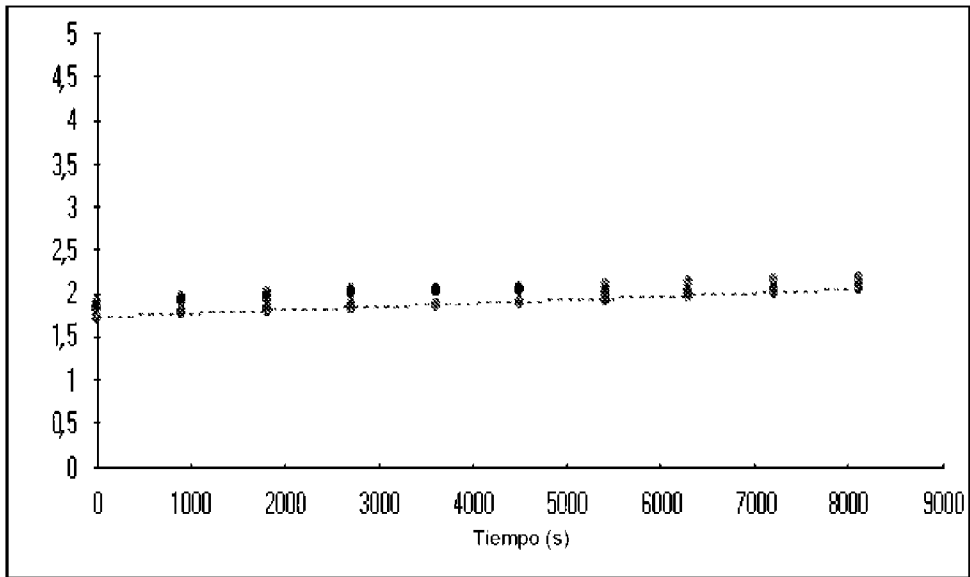


Figura 10

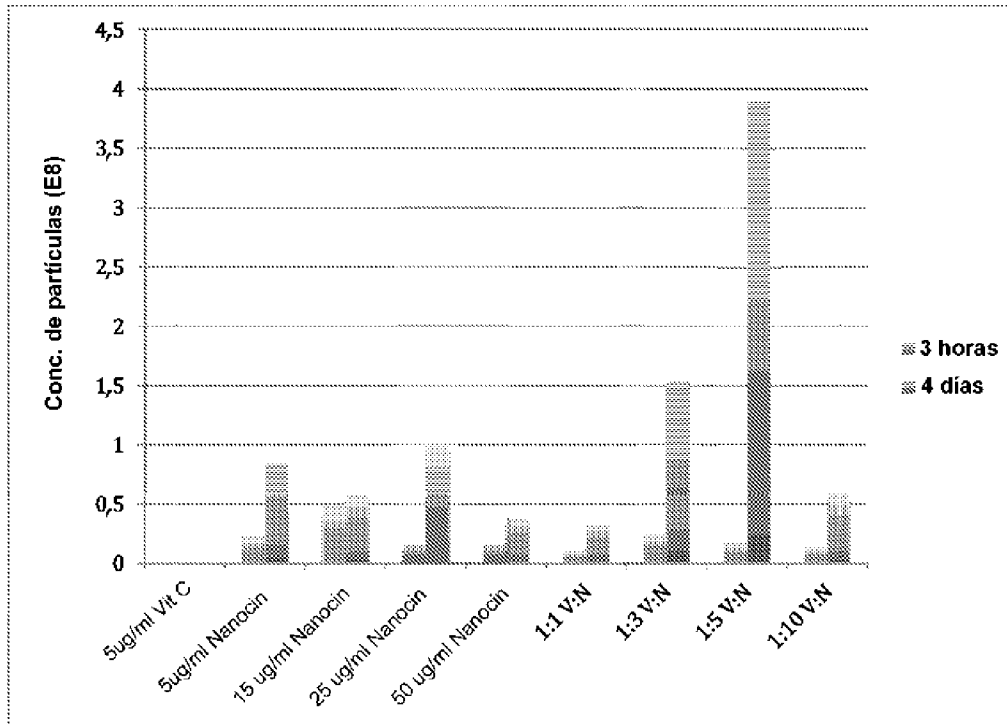


Figura 11

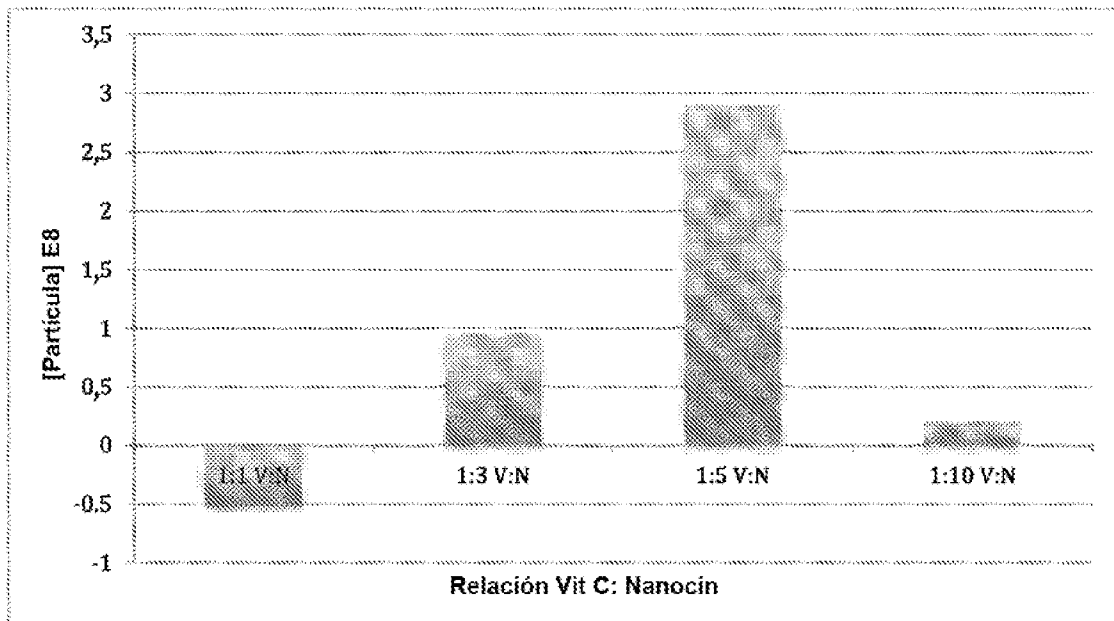


Figura 12

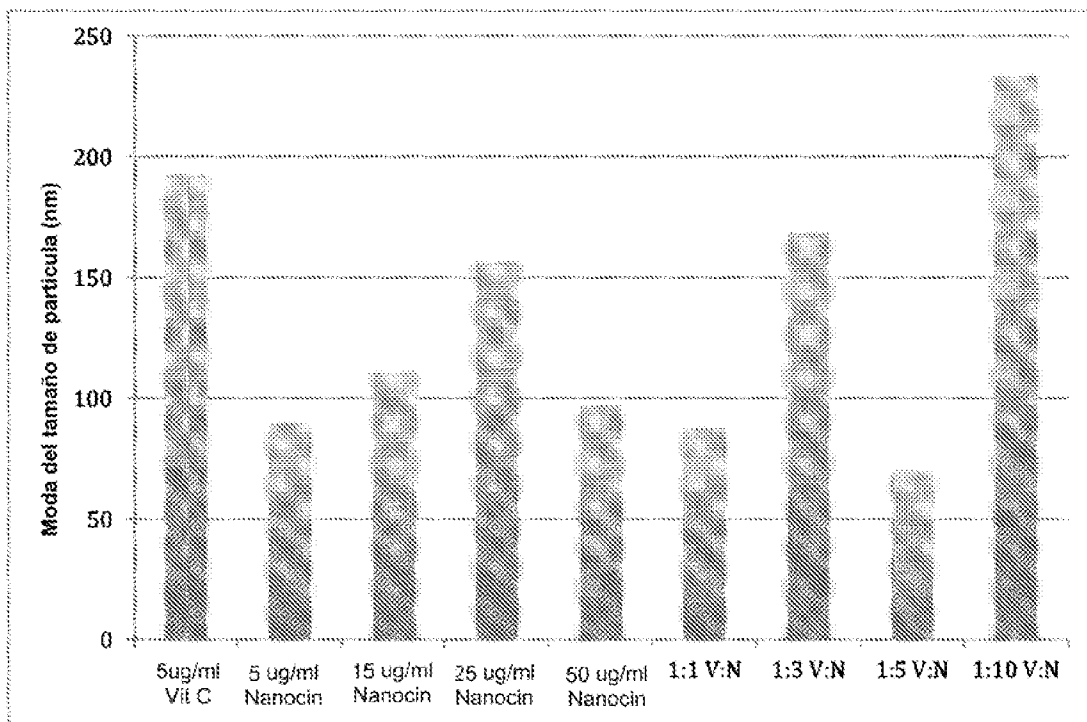


Figura 13

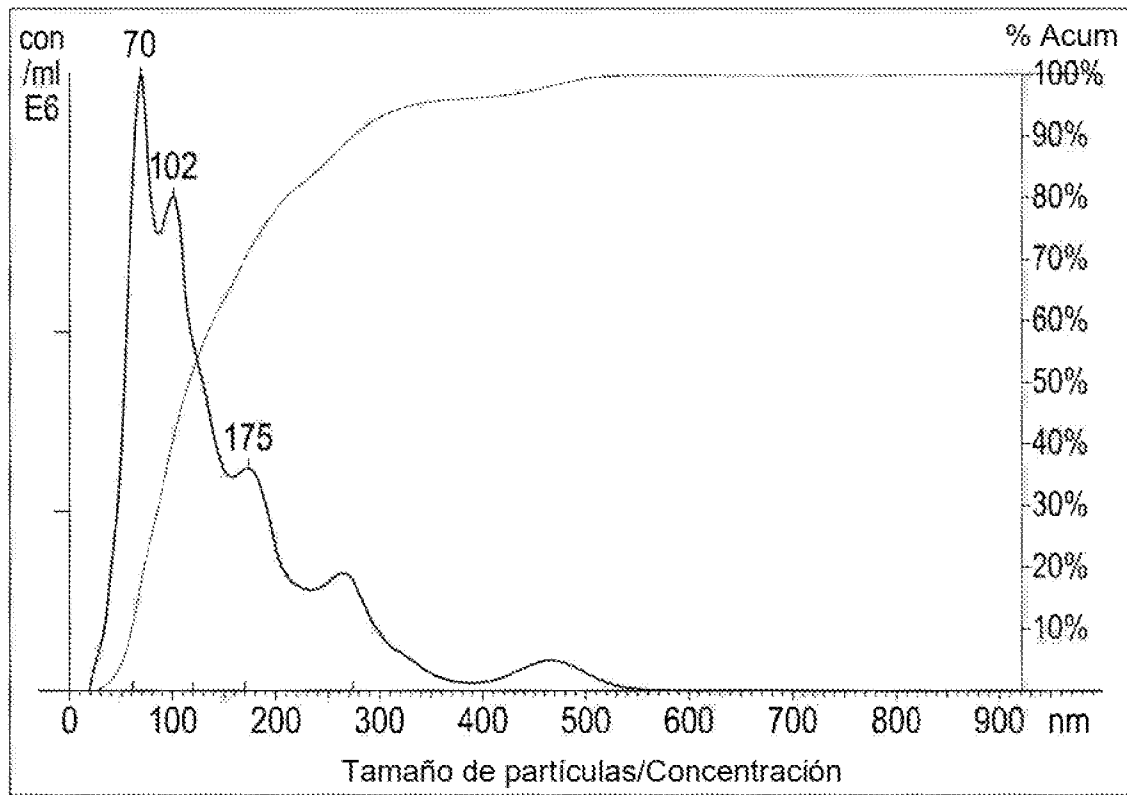


Figura 14

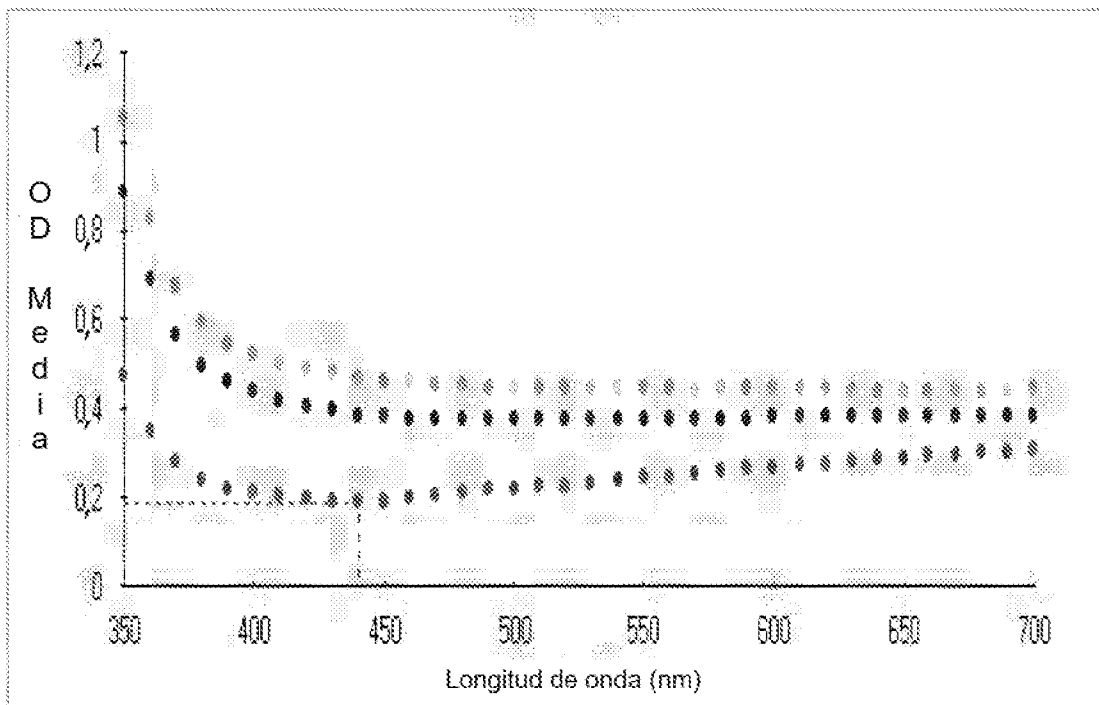


Figura 15

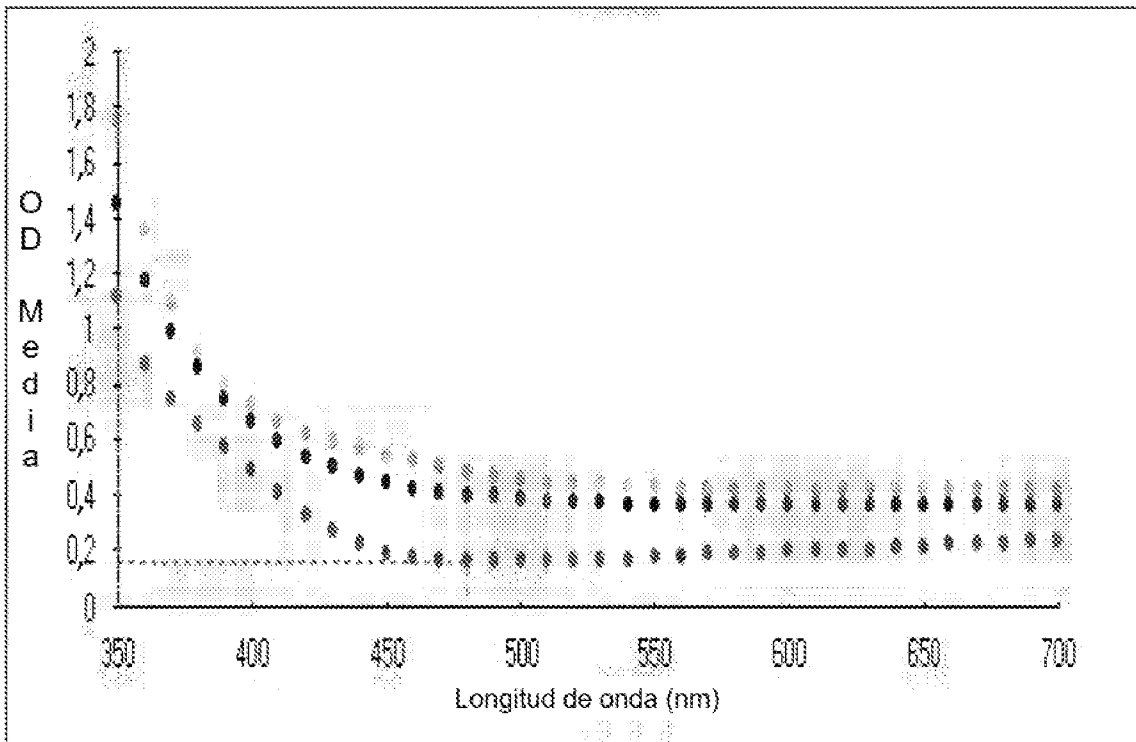


Figura 16

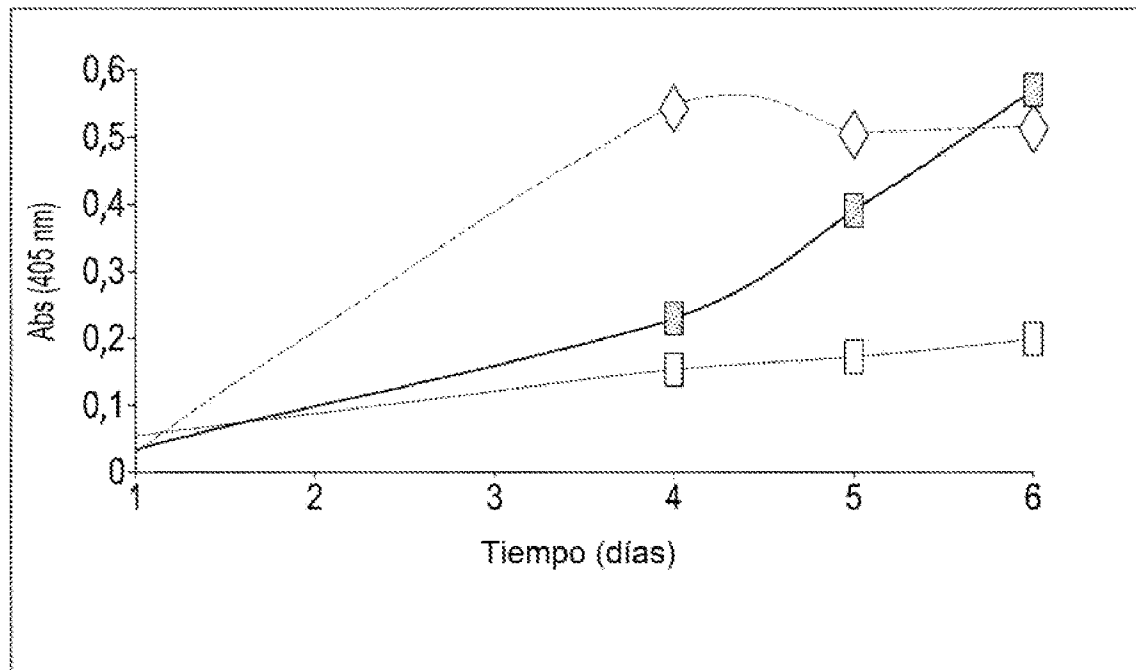


Figura 17A

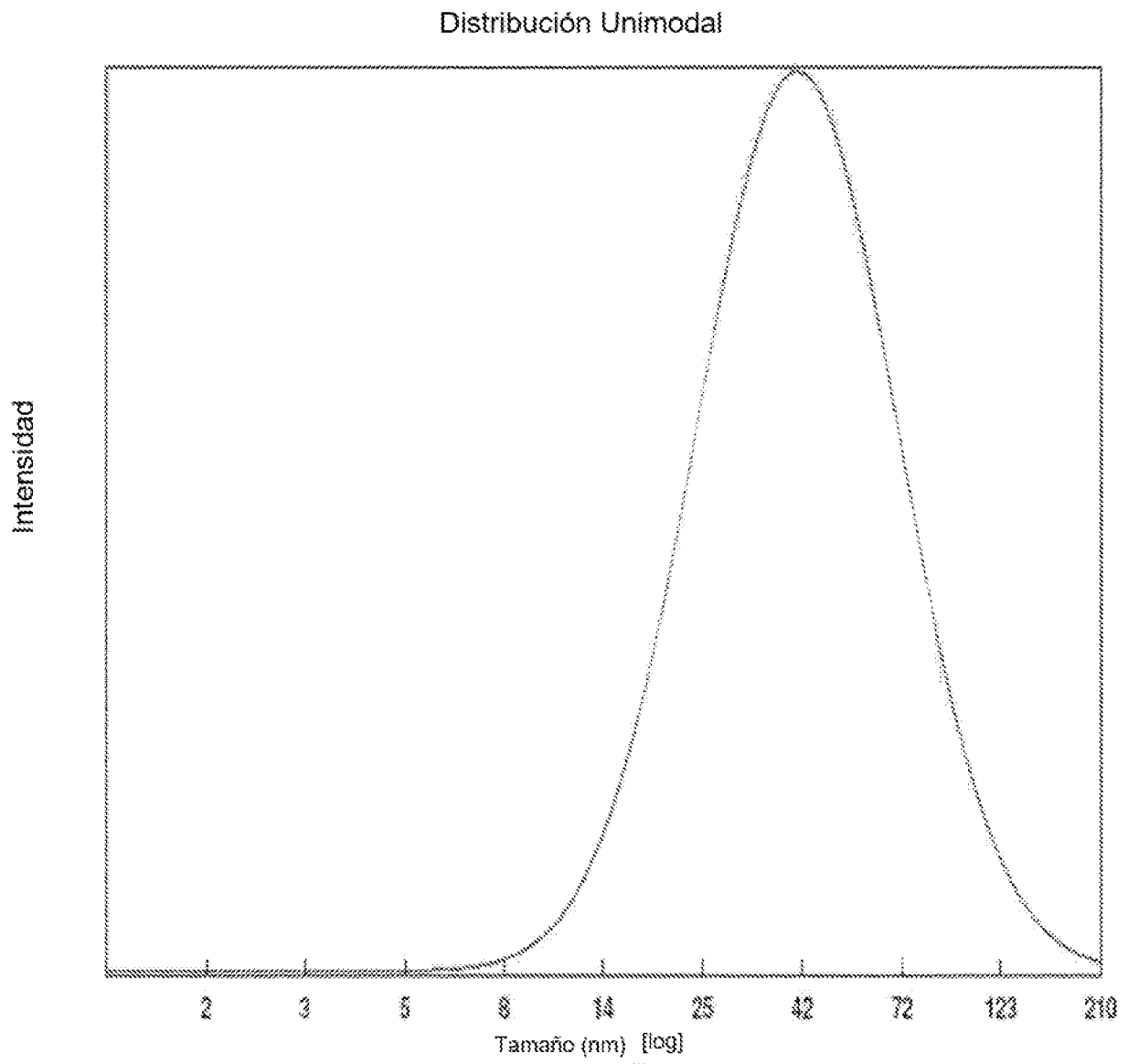


Figura 17B

Análisis de intensidad SDP del conjunto SDP 1

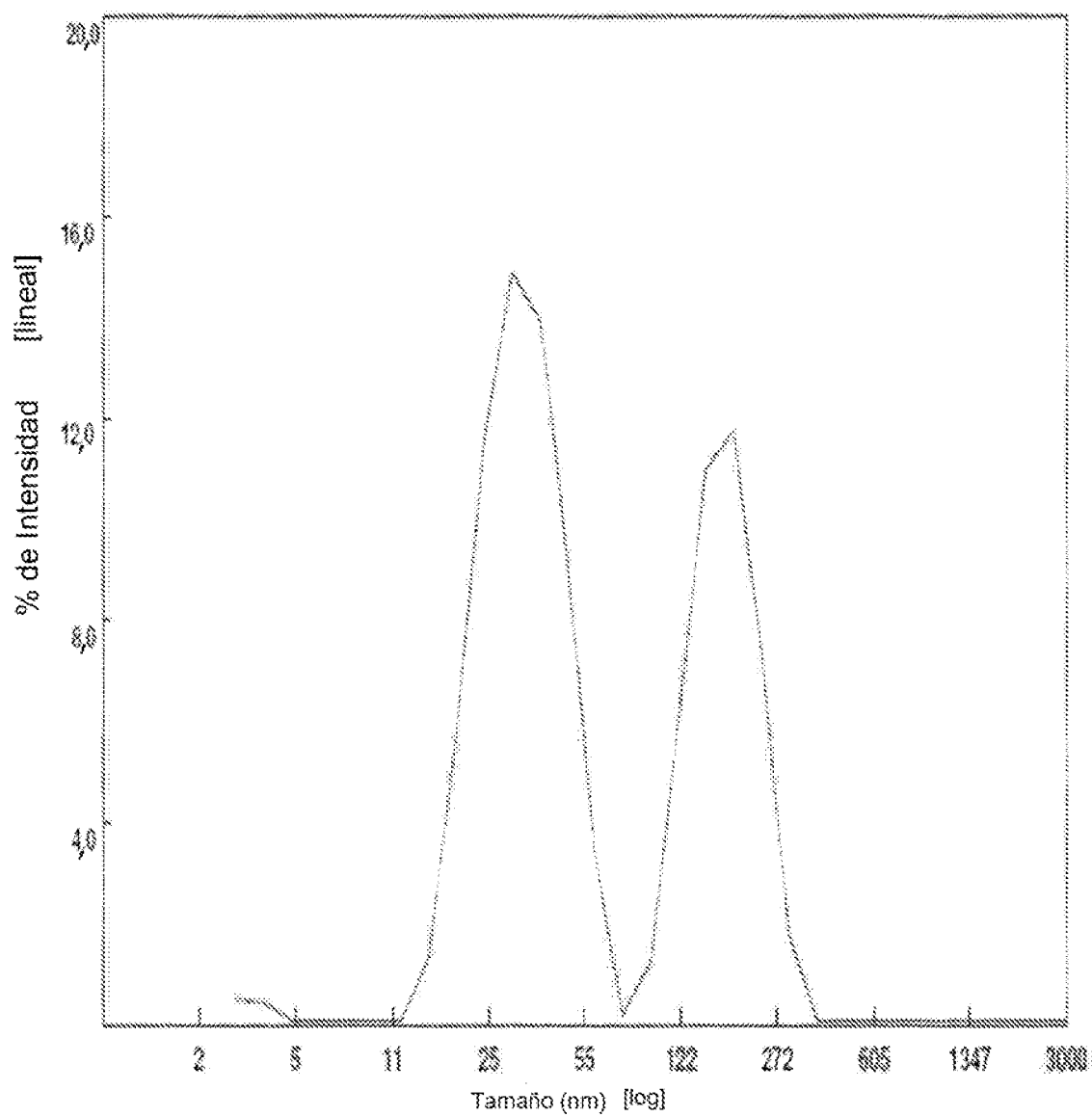


Figura 17C

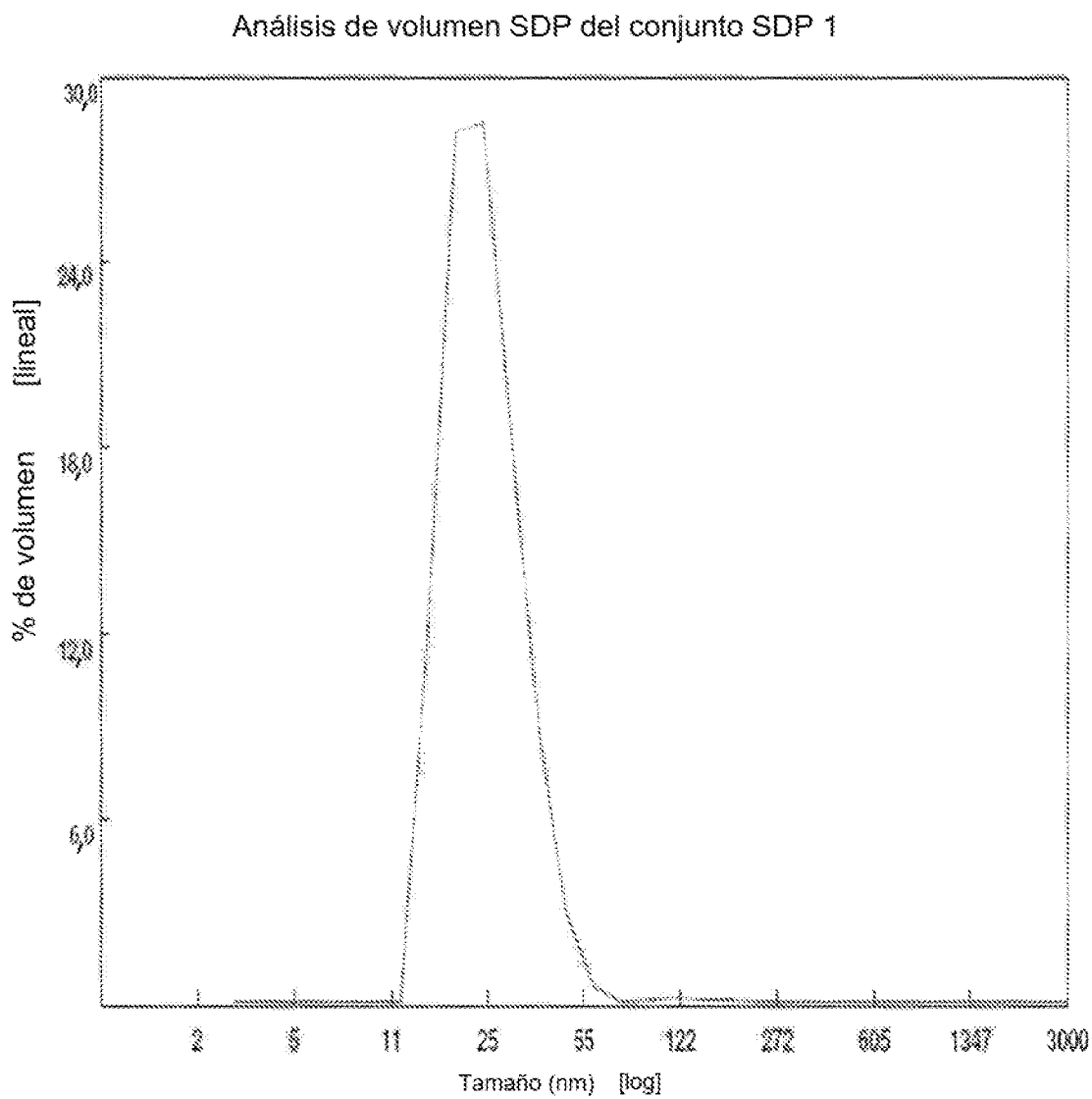


Figura 17D

Análisis del número SDP del conjunto SDP 1

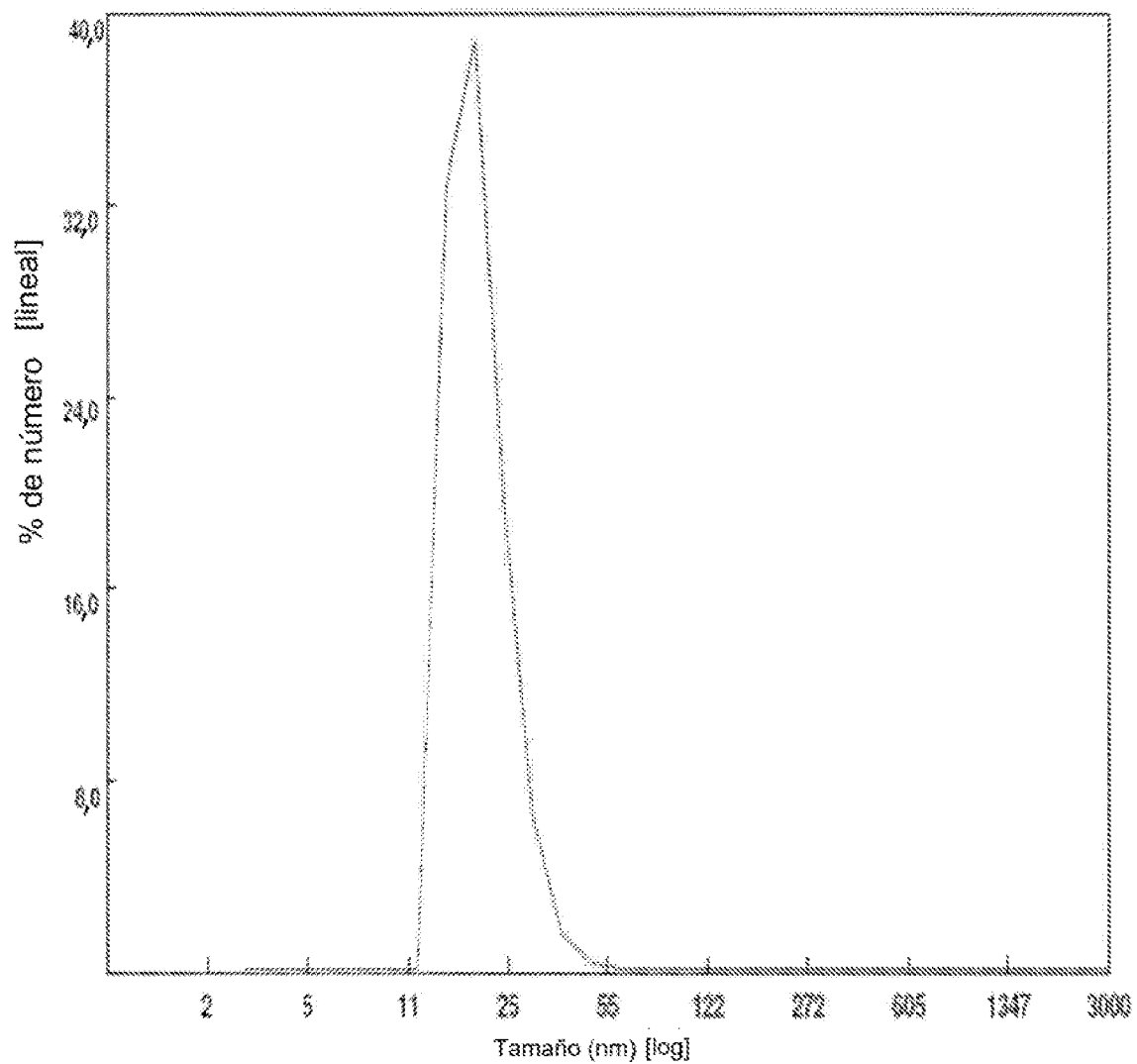


Figura 18A

Distribución unimodal

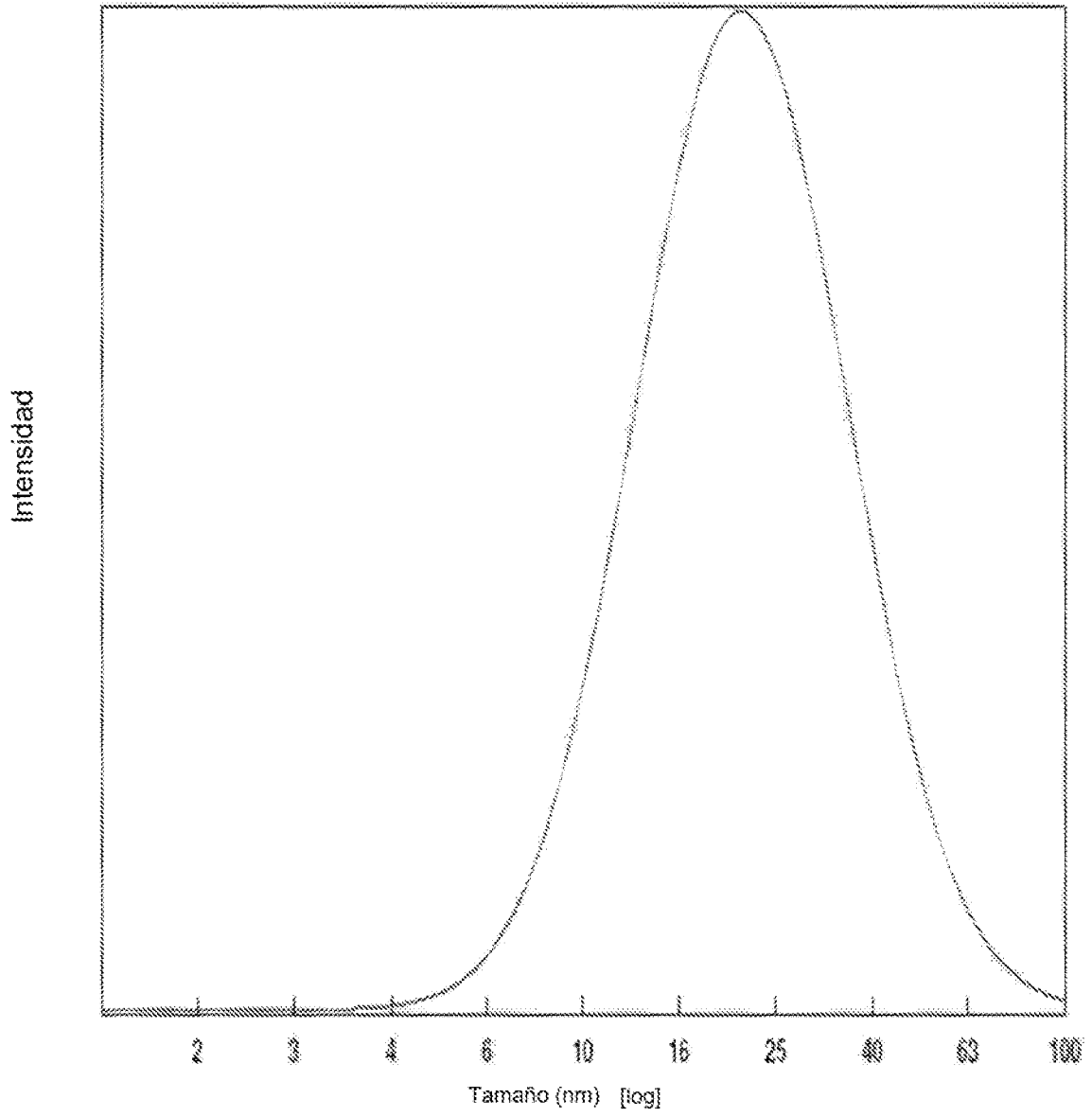


Figura 18B

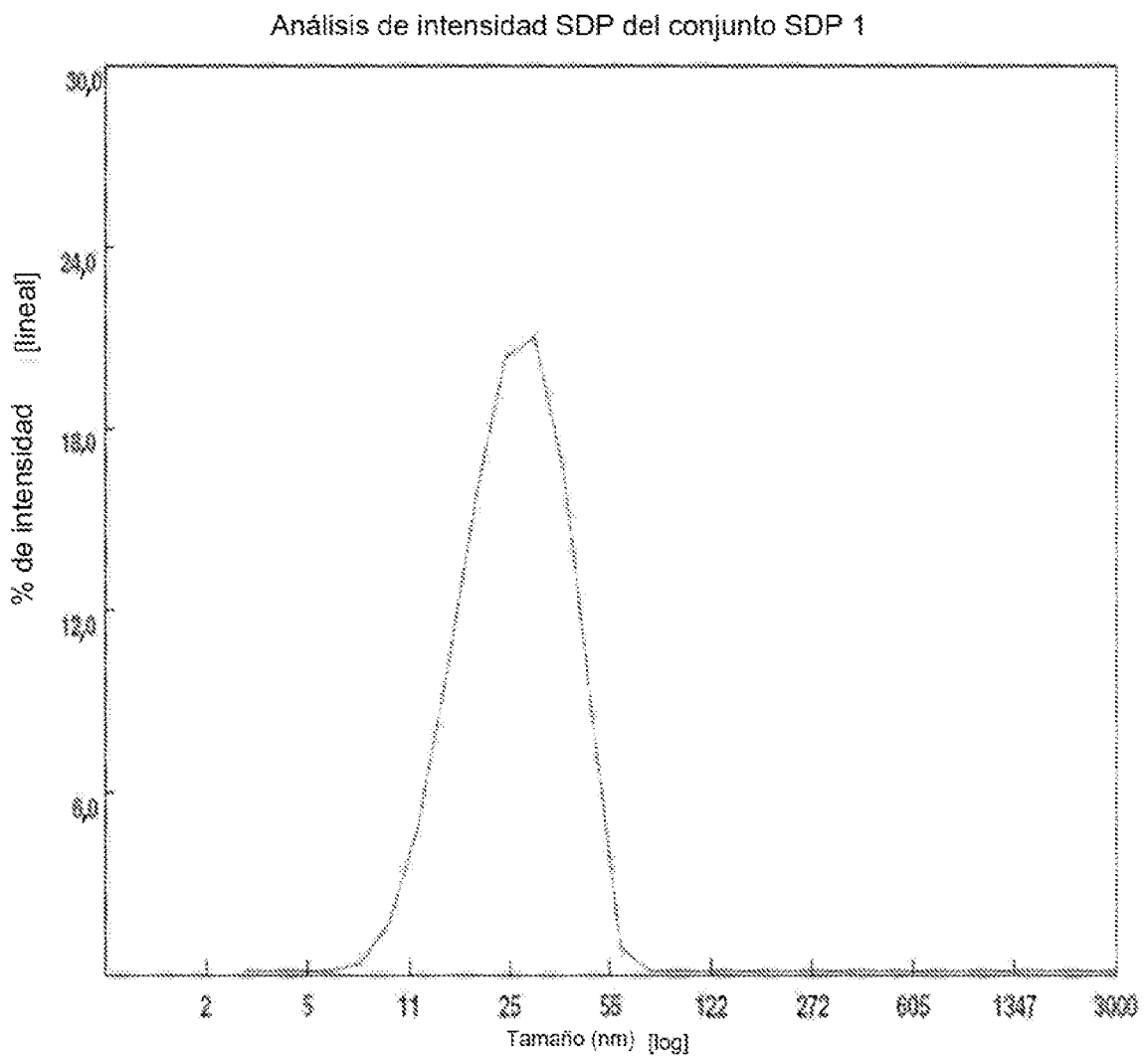


Figura 18C

Análisis de volumen SDP del conjunto SDP 1

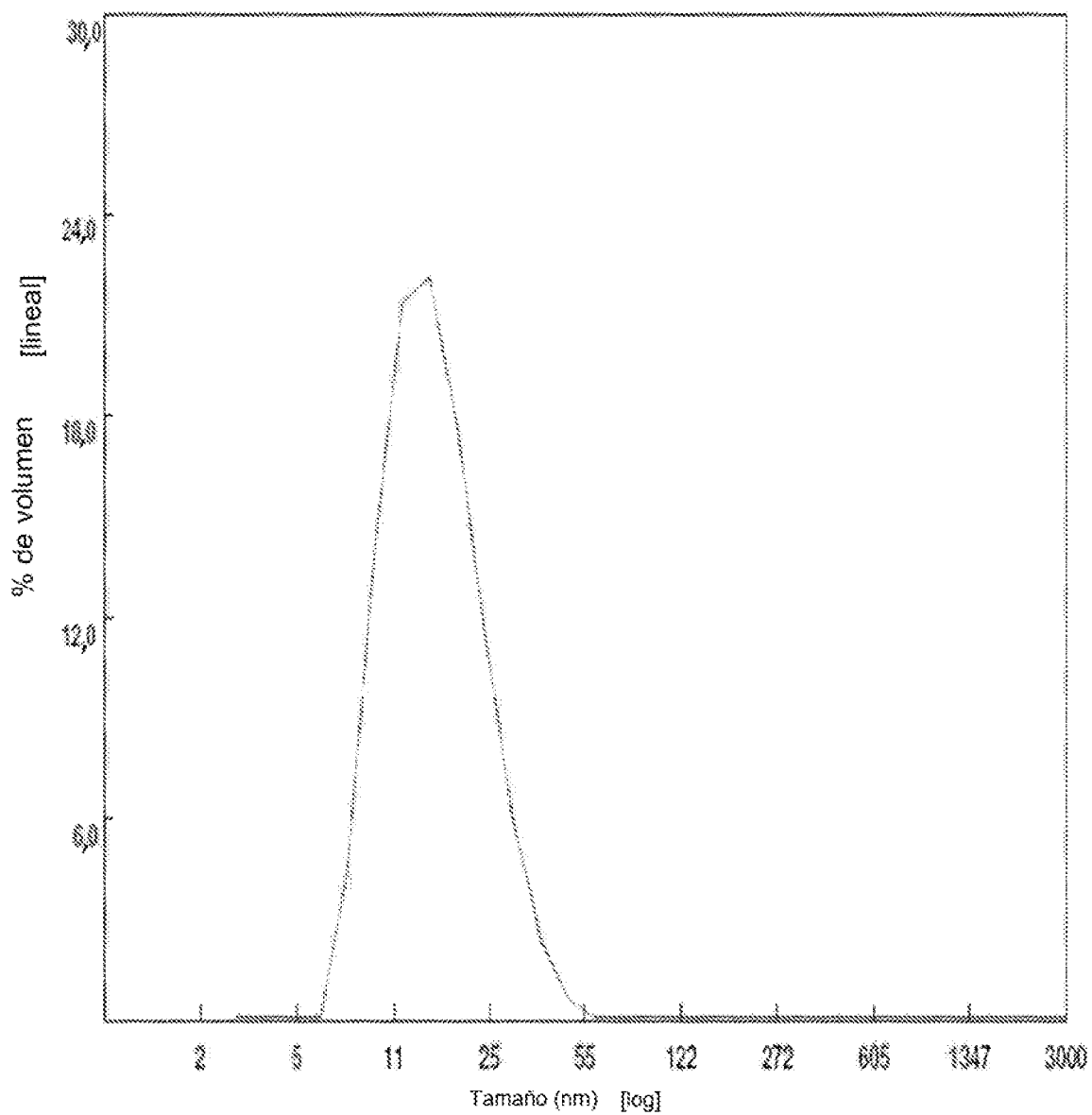


Figura 18D

Análisis del número SDP del conjunto SDP 1

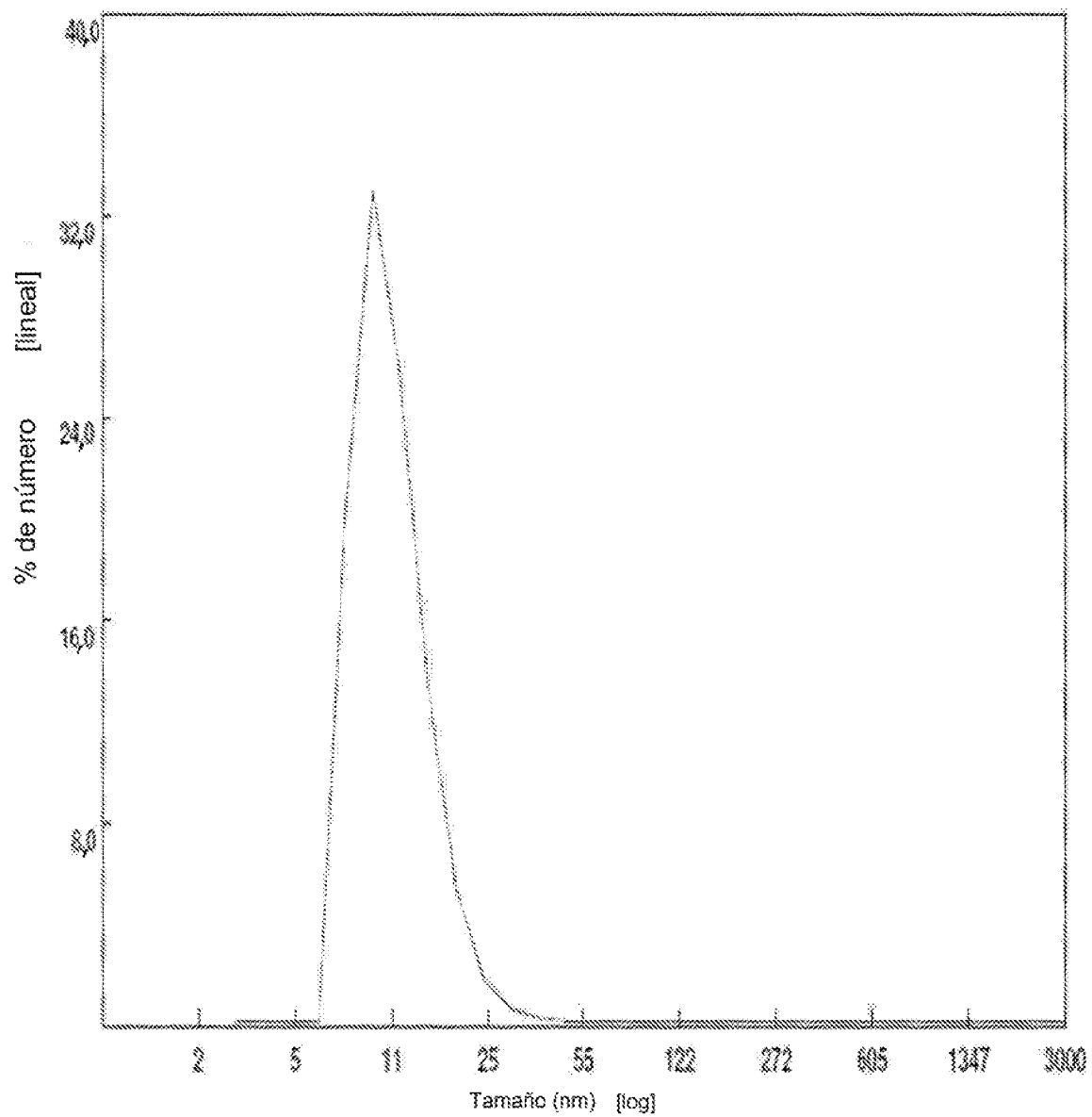


Figura 19A

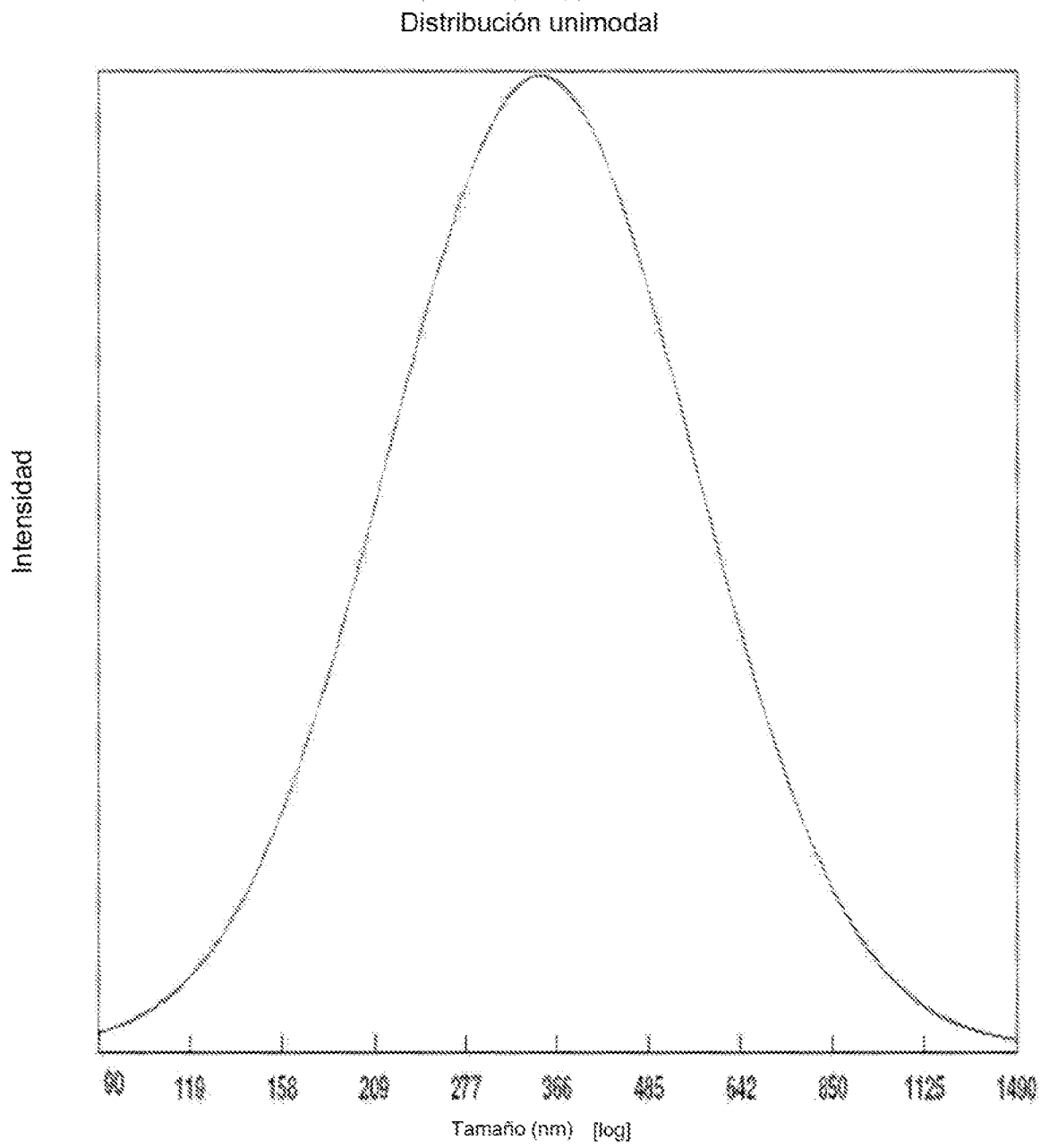


Figura 19B

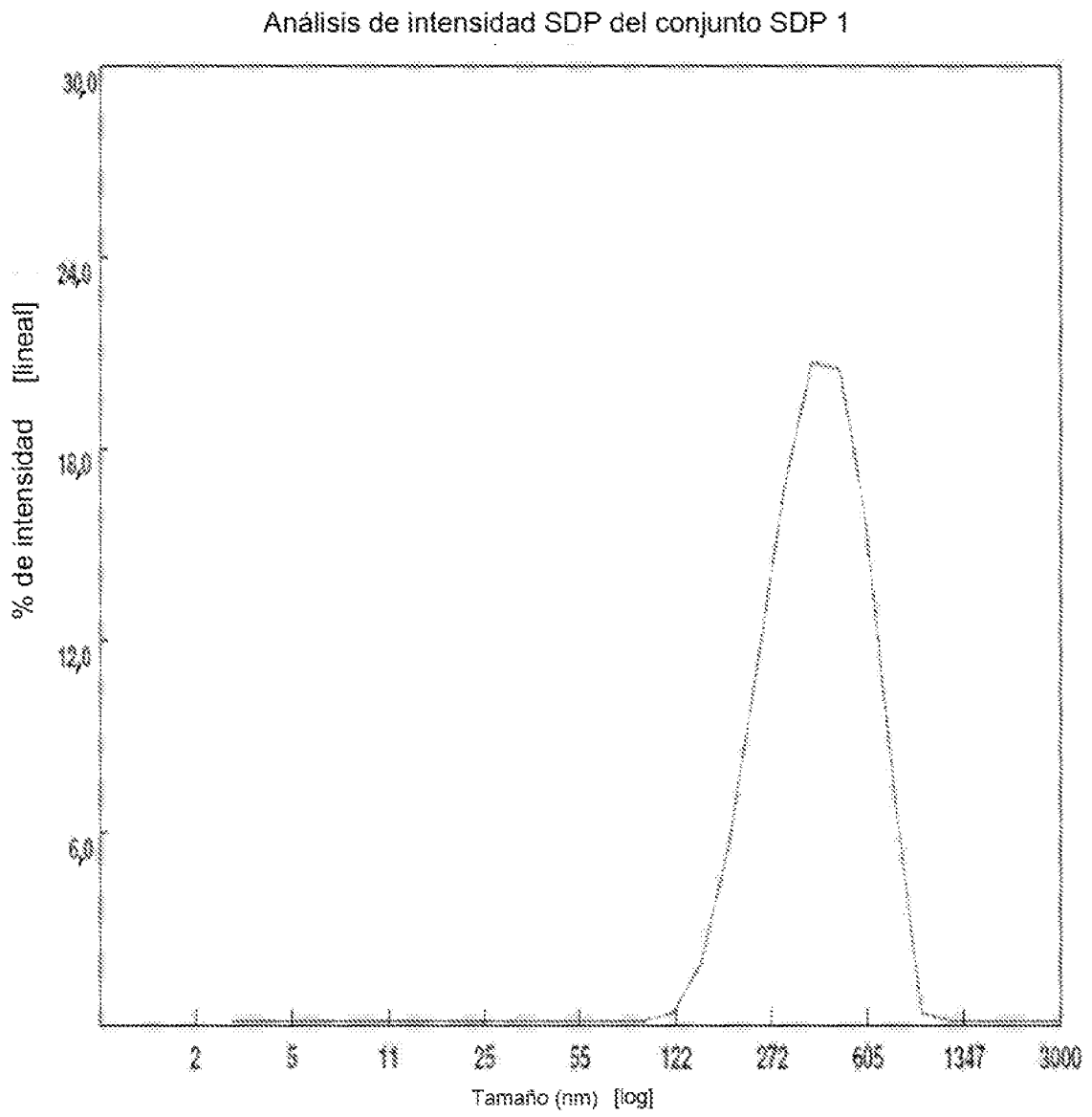


Figura 19C

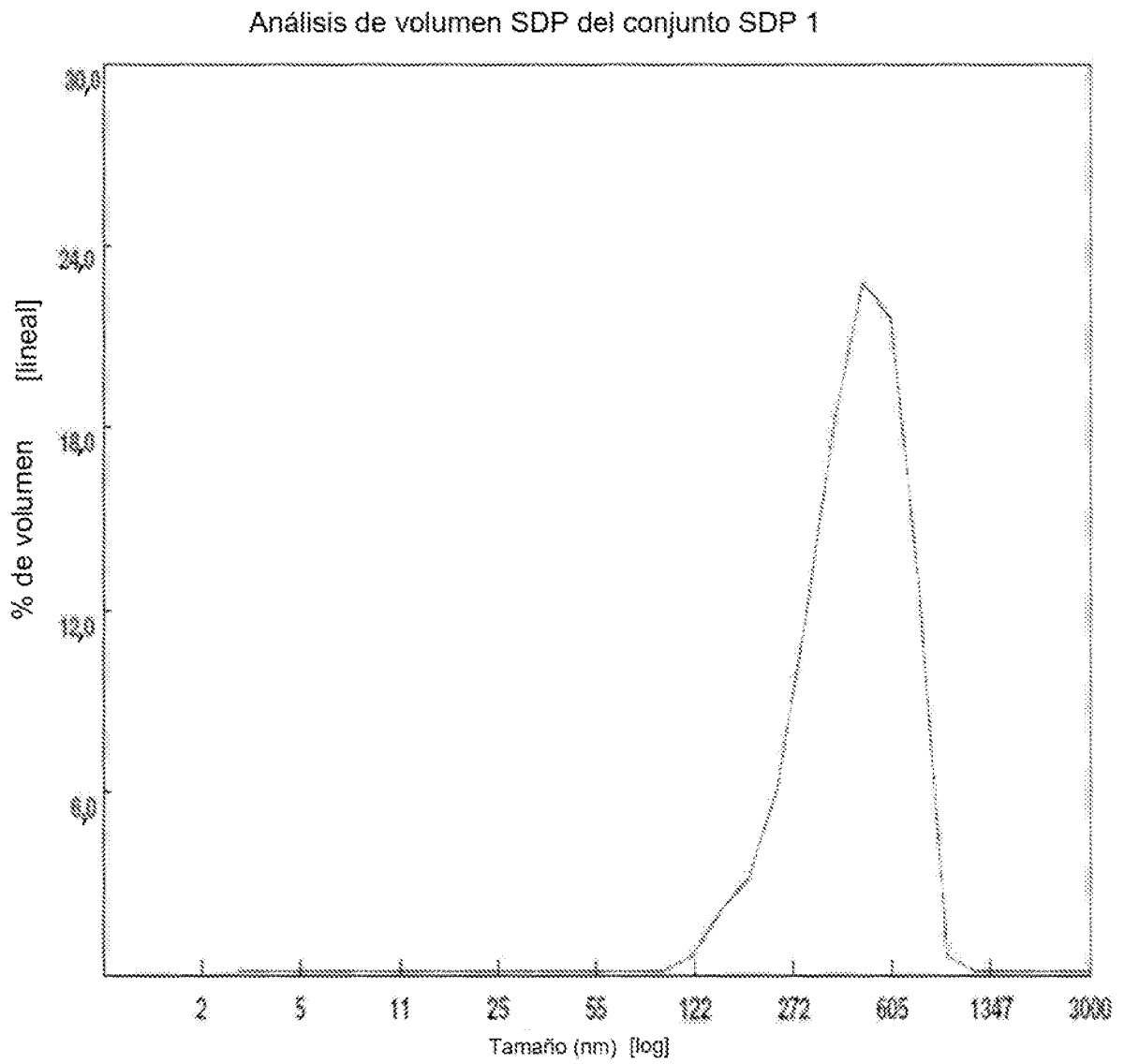


Figura 19D

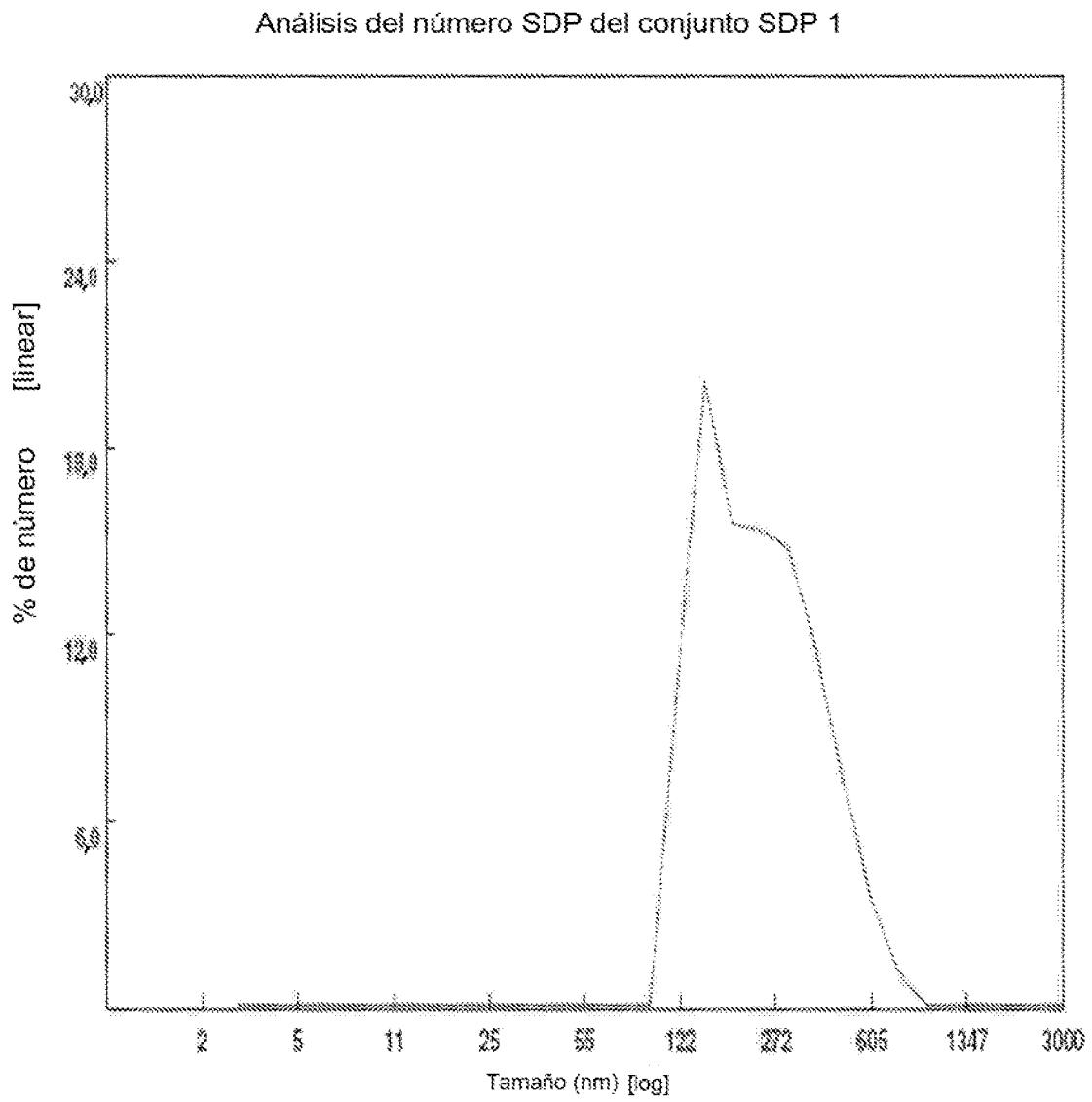


Figura 20A

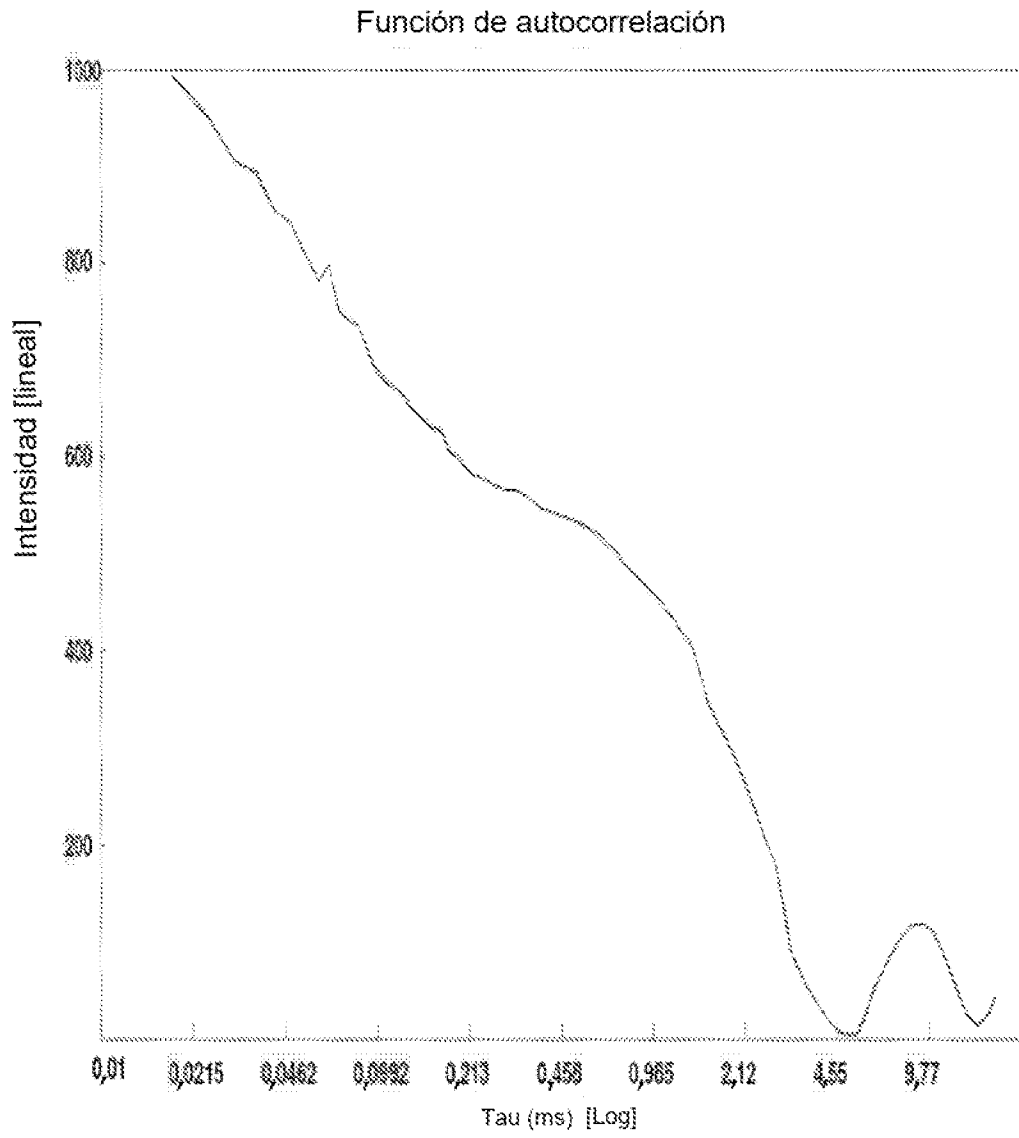


Figura 20B

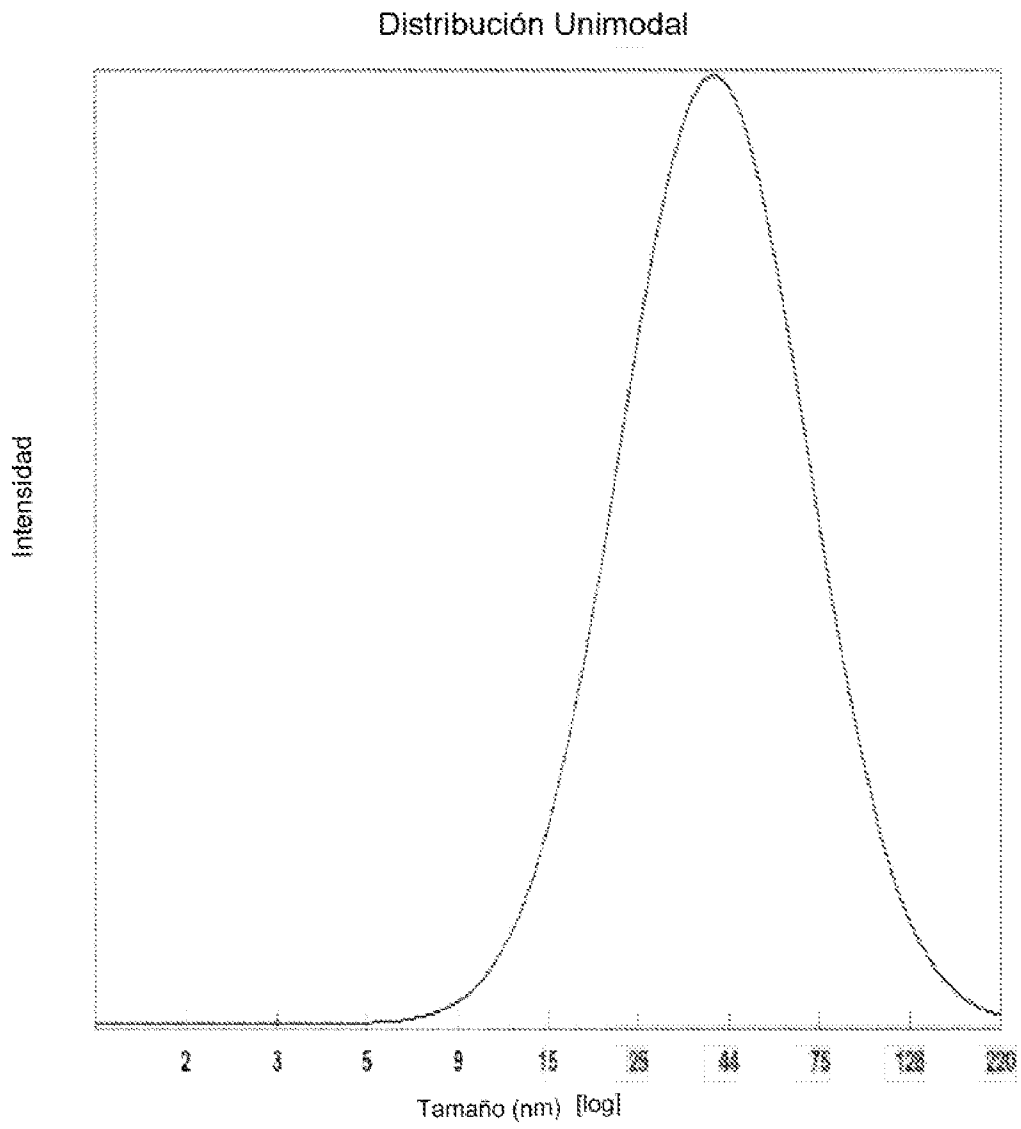


Figura 20C

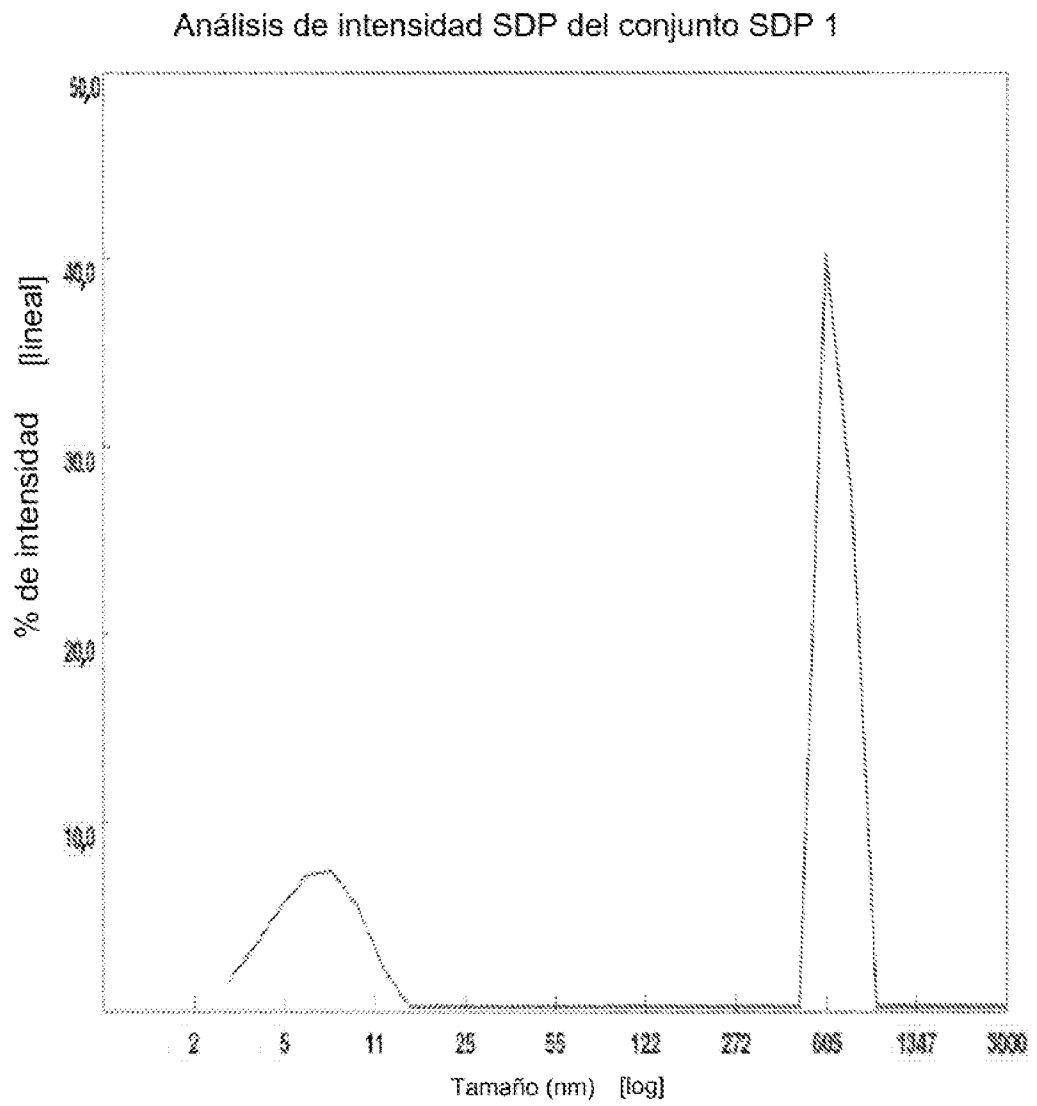


Figura 20D

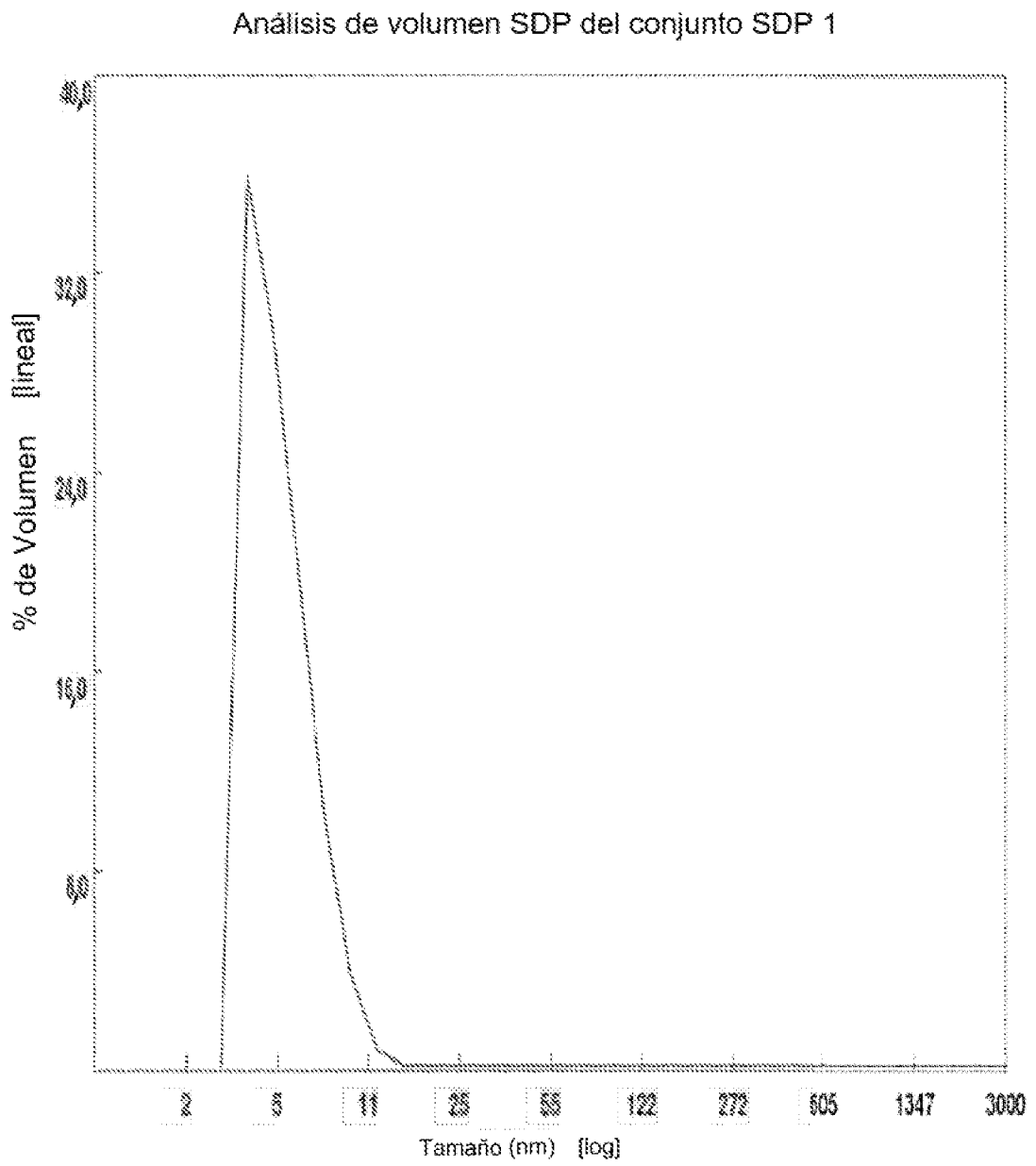


Figura 20E

Análisis del número SDP del conjunto SDP 1

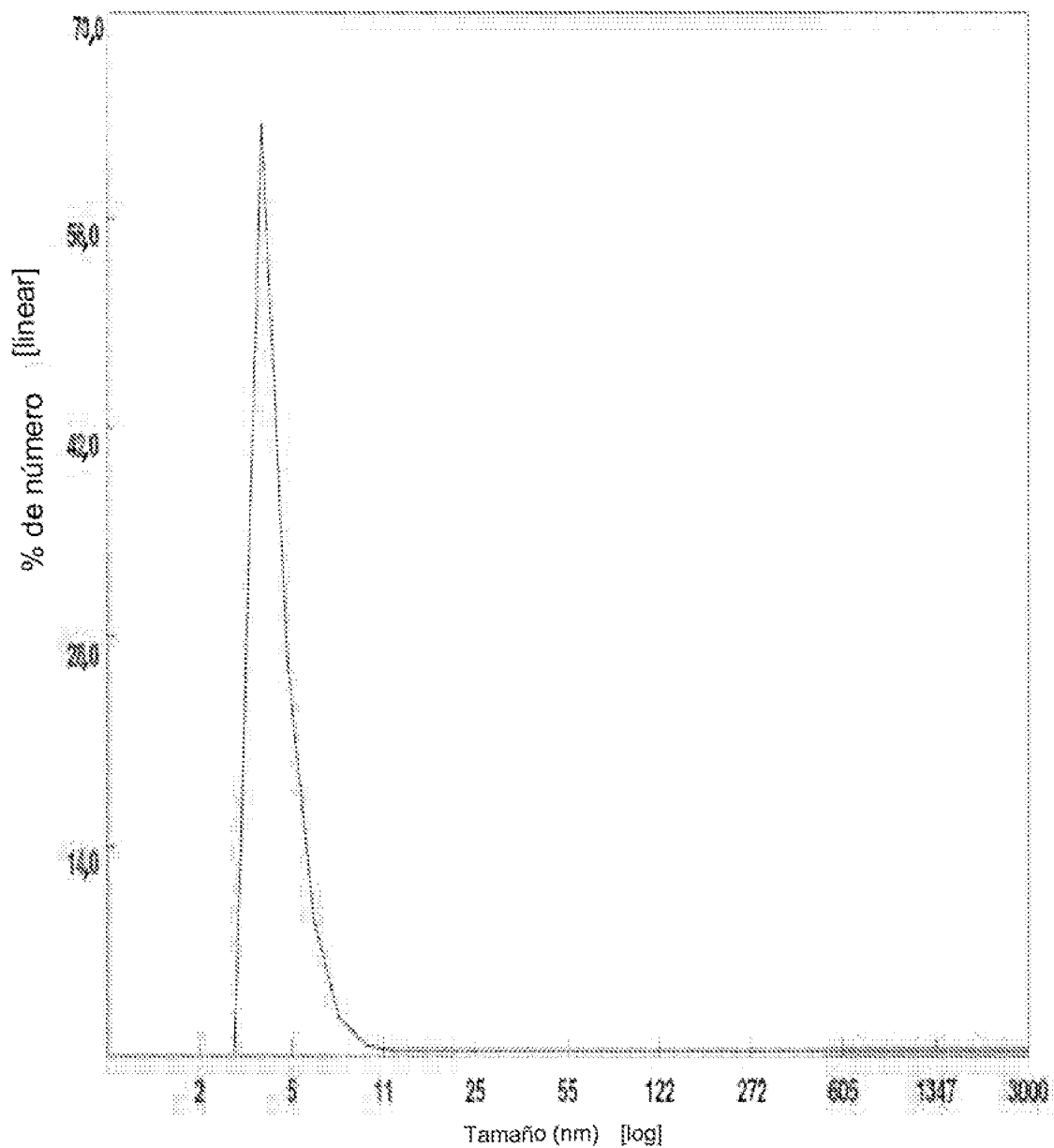


Figura 21A

Función de autocorrelación

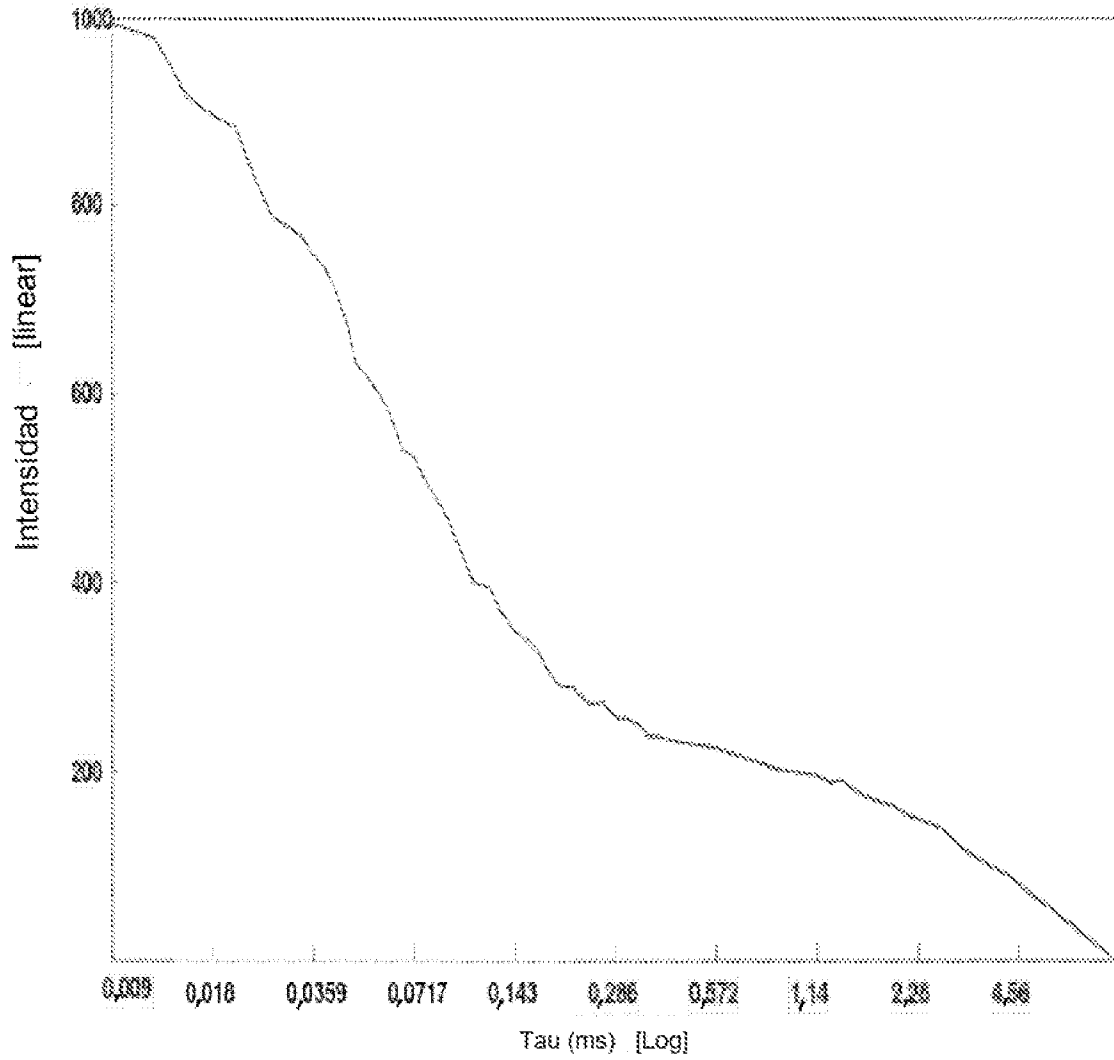


Figura 21B

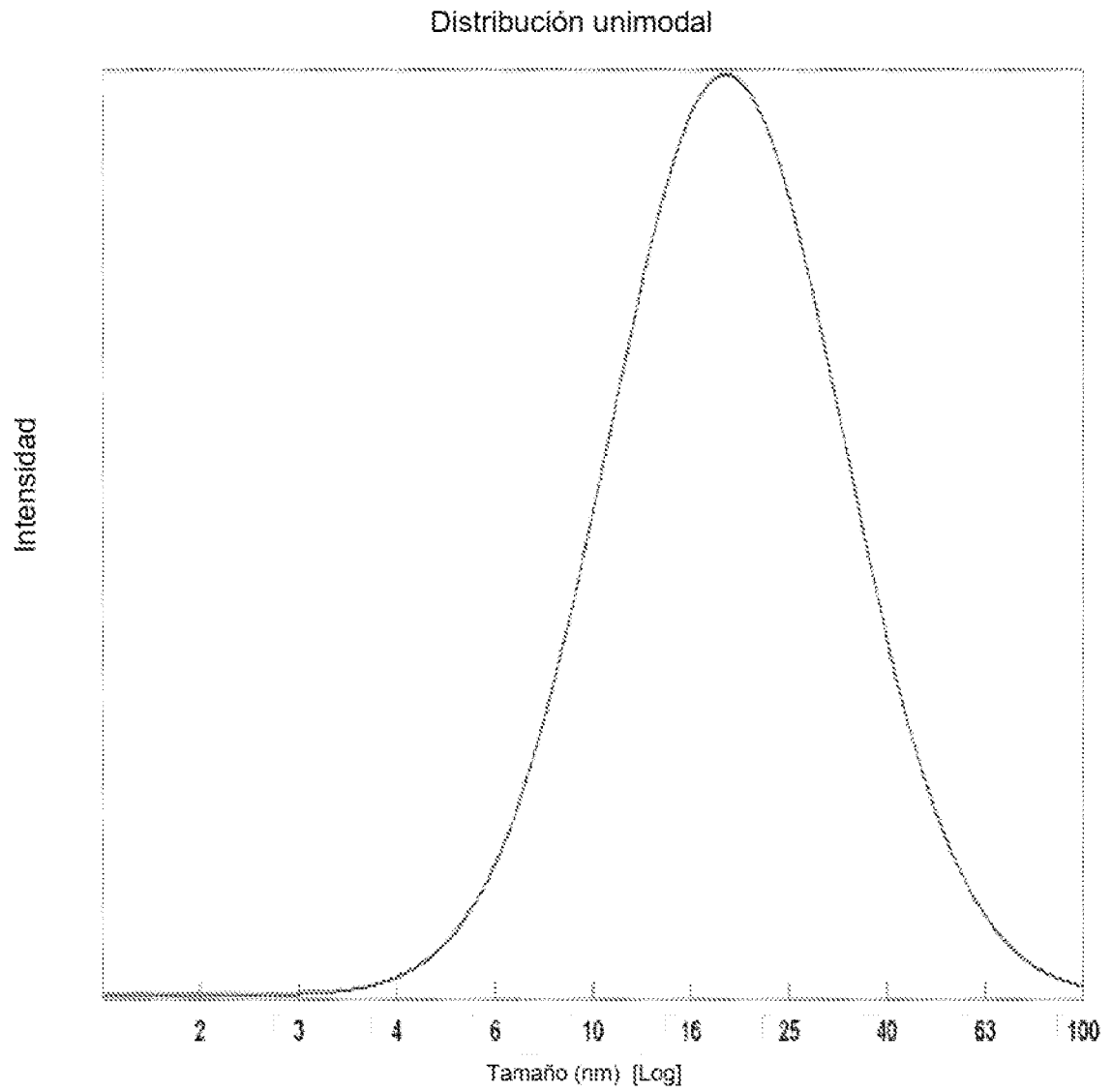


Figura 21C

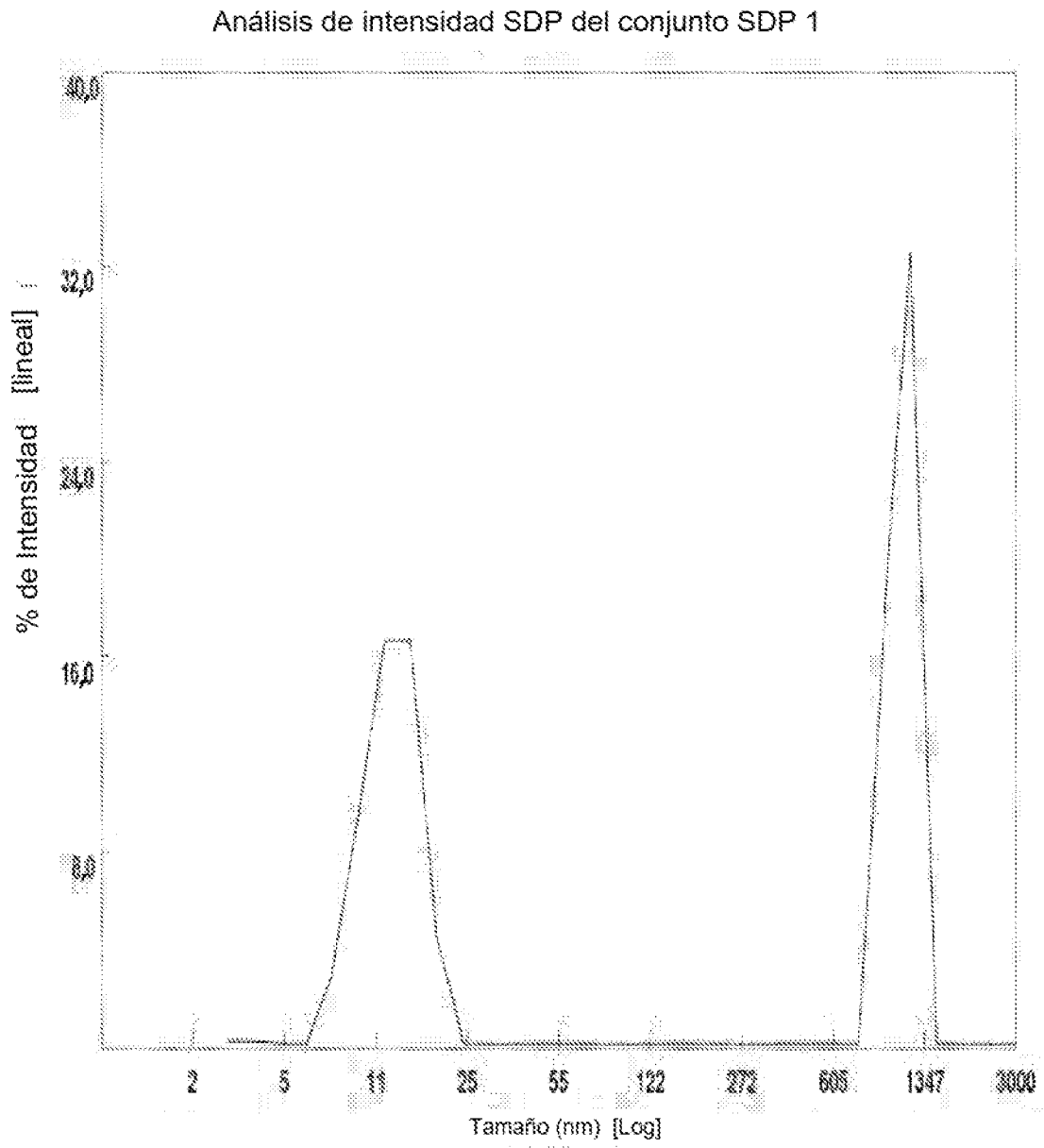


Figura 21D

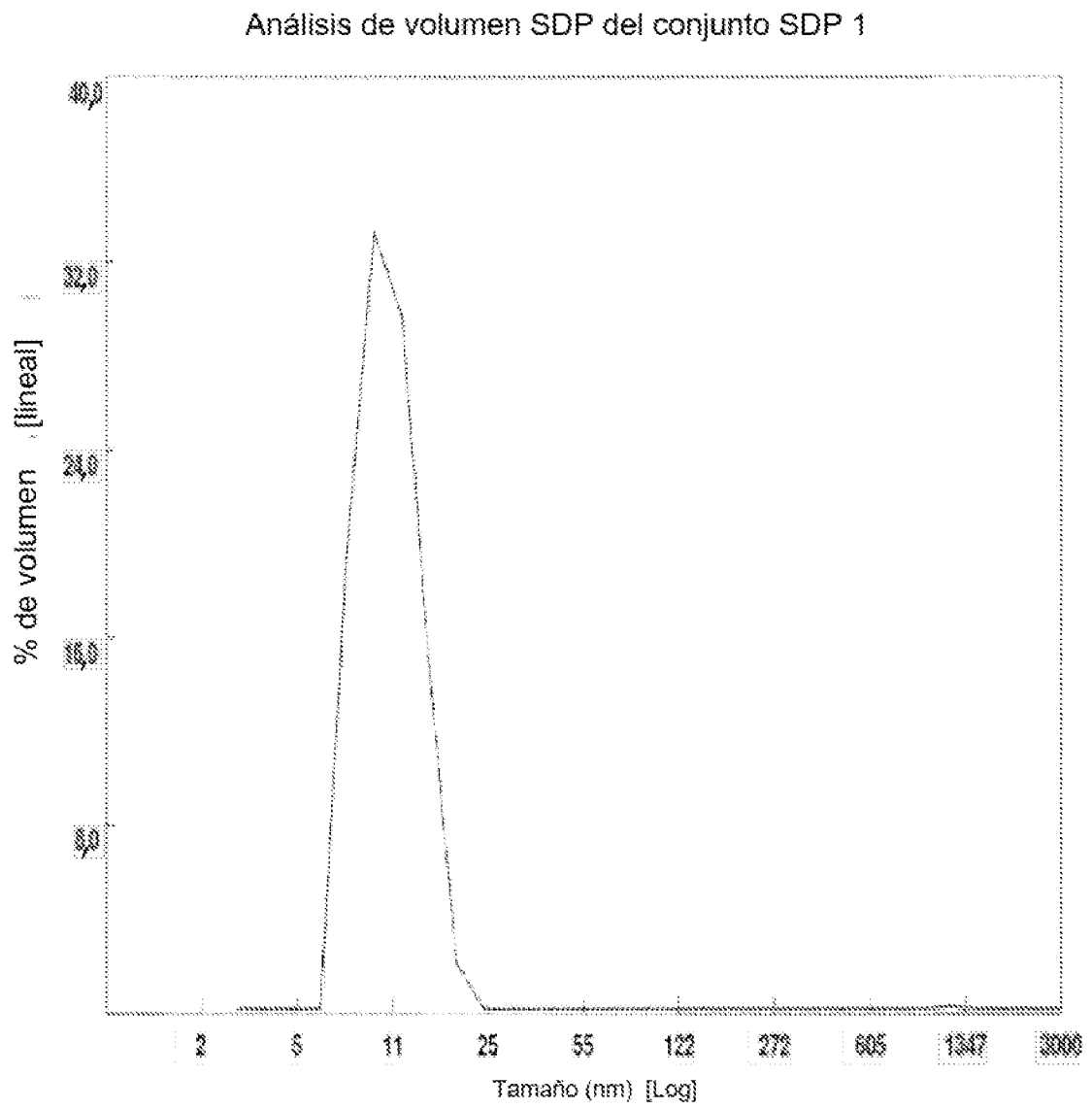


Figura 21E

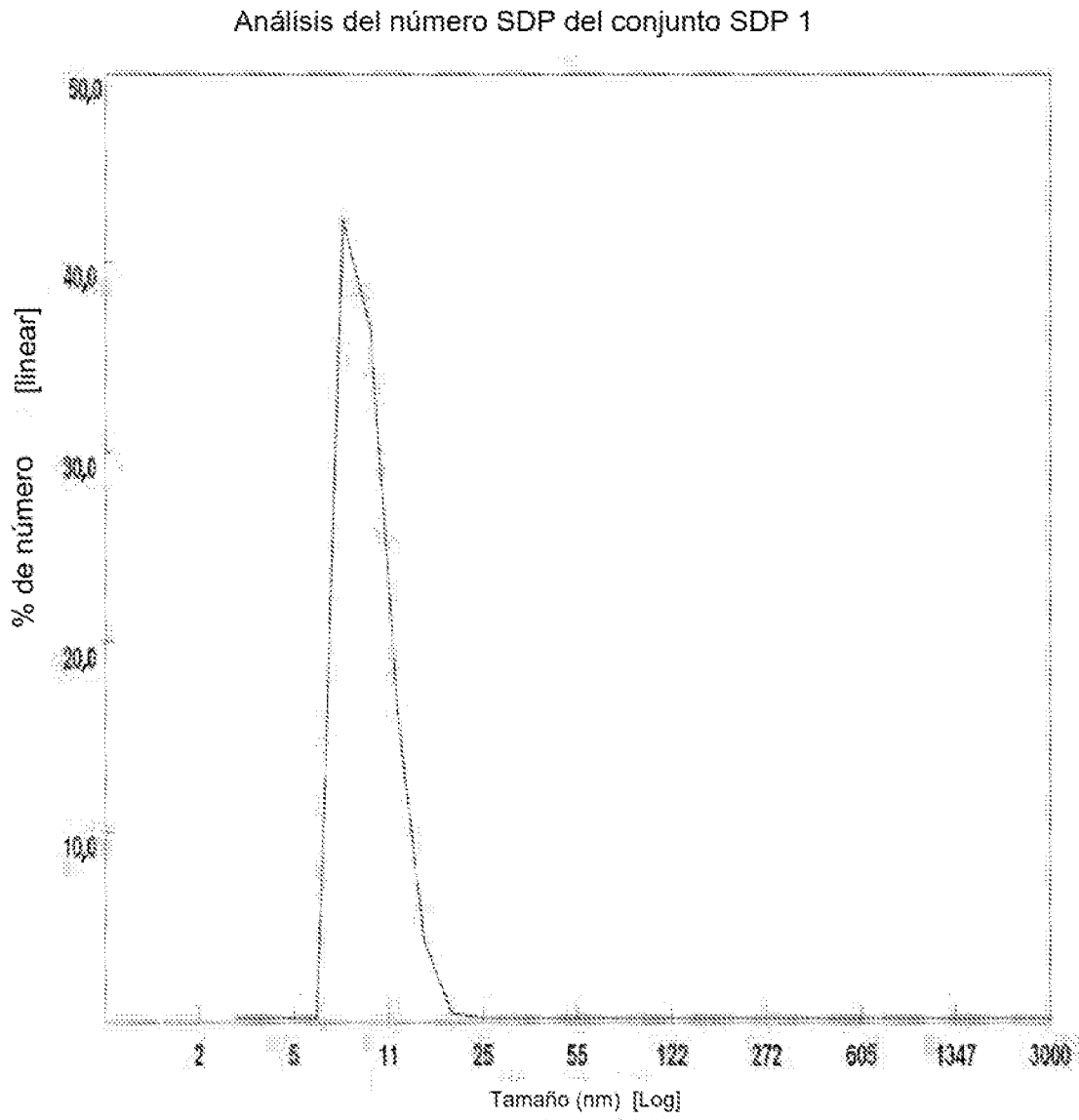


Figura 22A

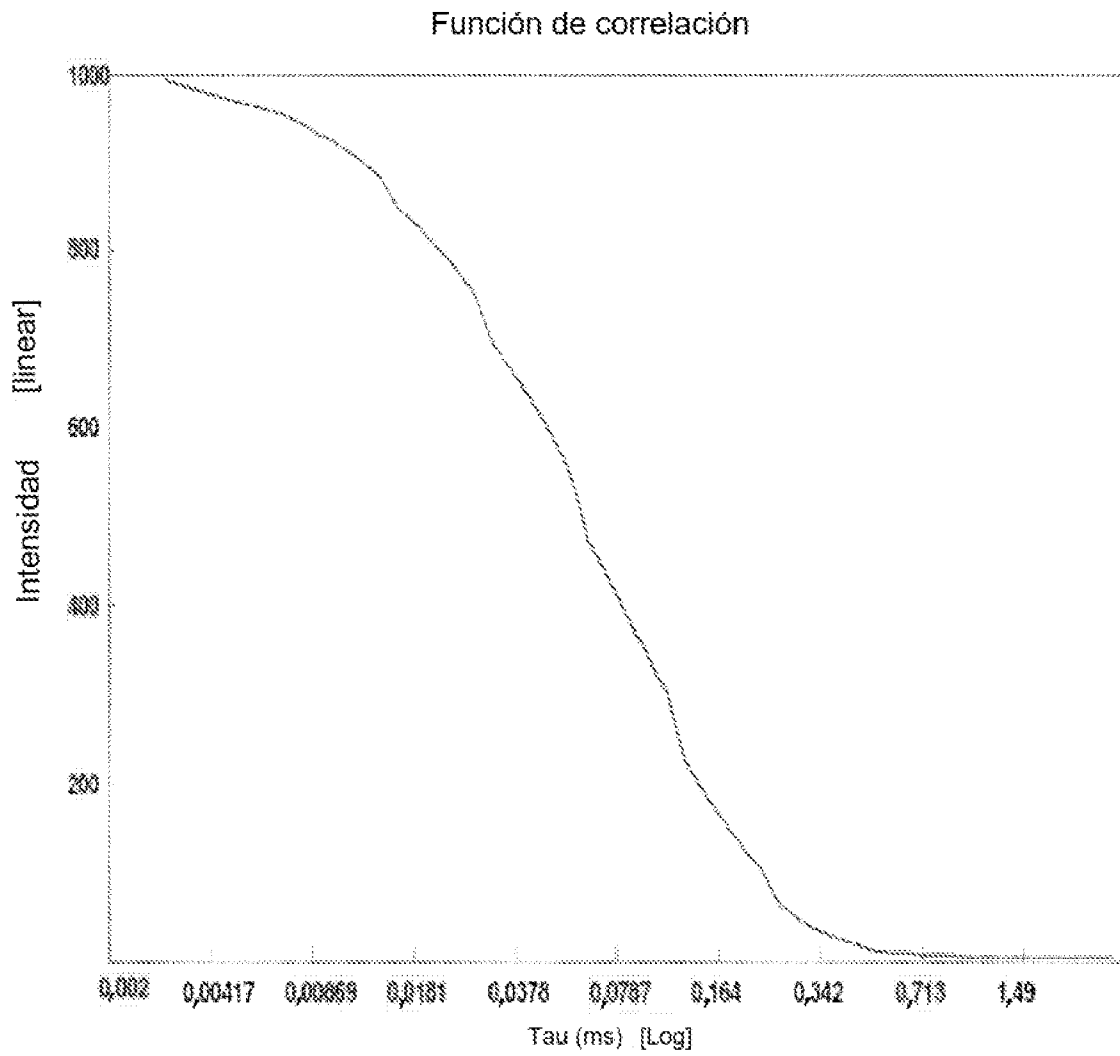


Figura 22B

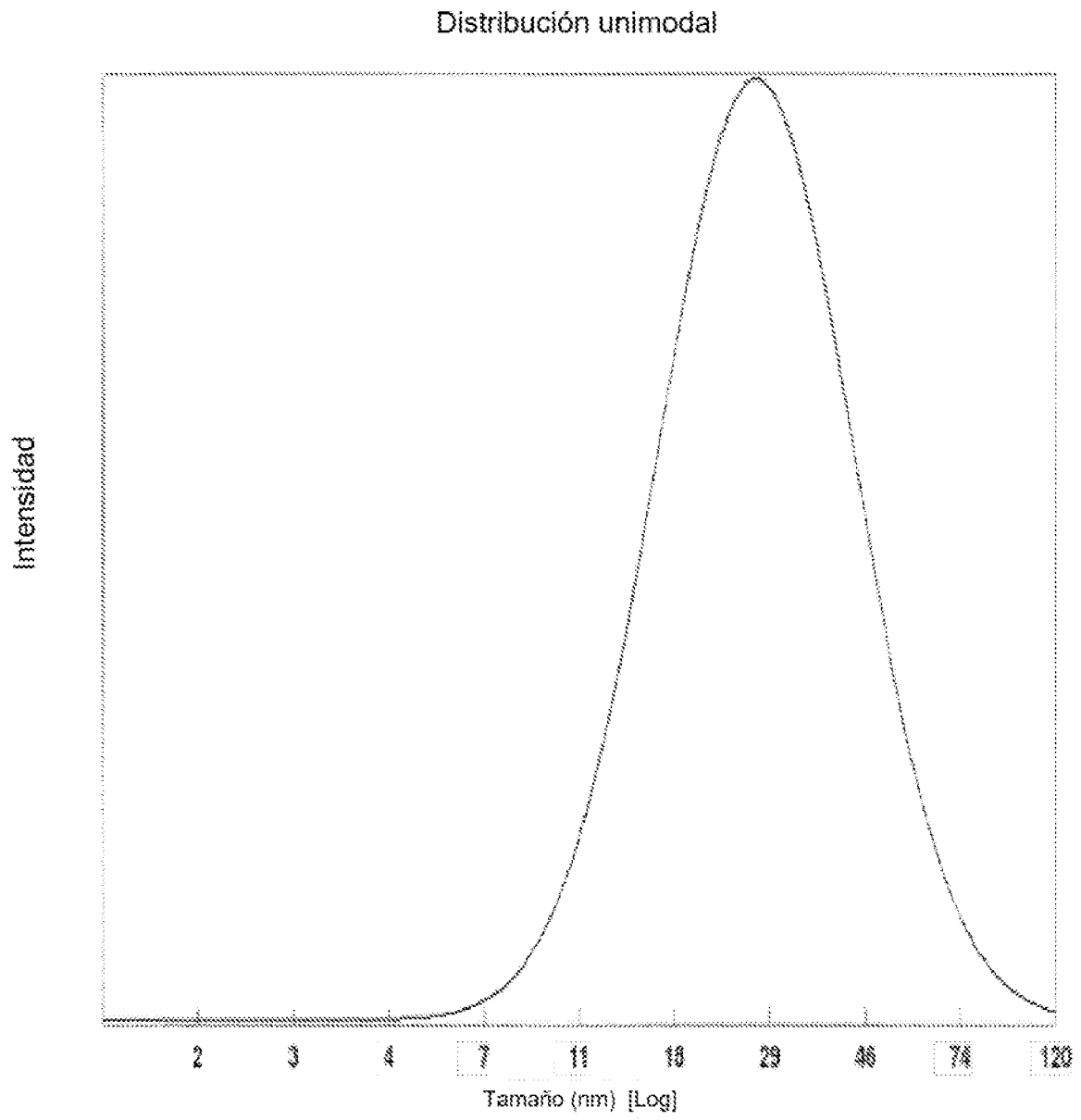


Figura 22C

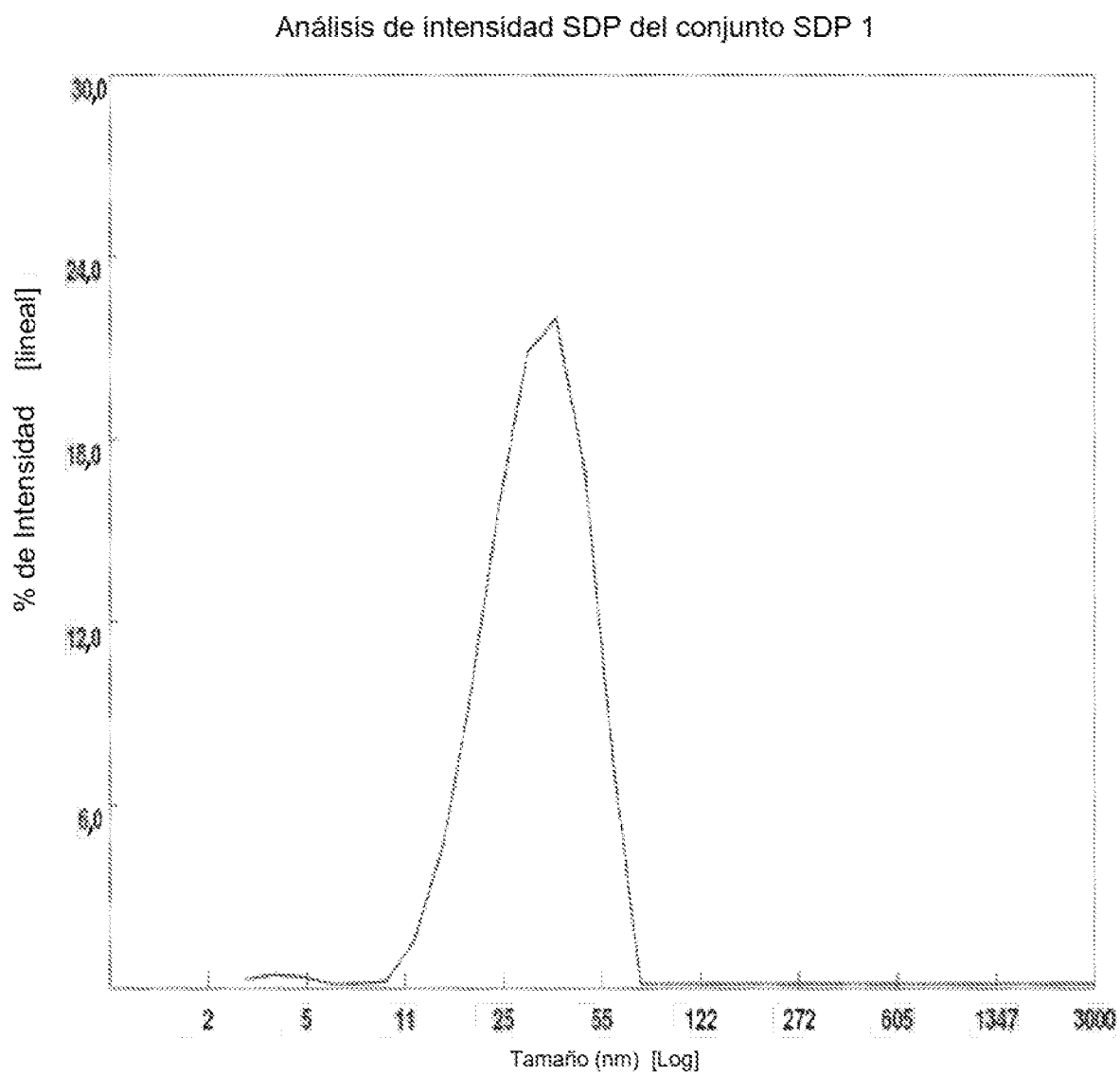


Figura 22D

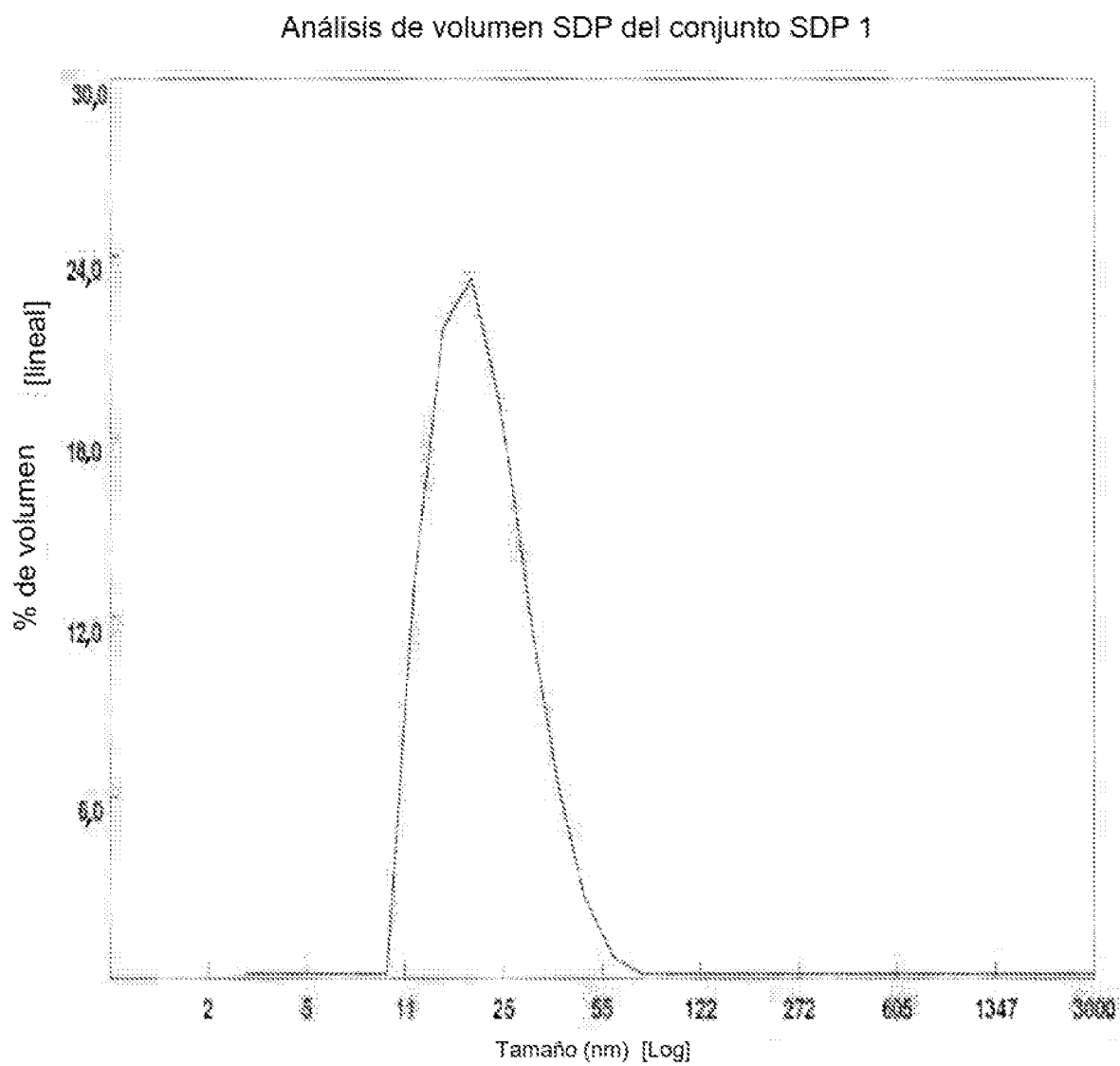


Figura 22E

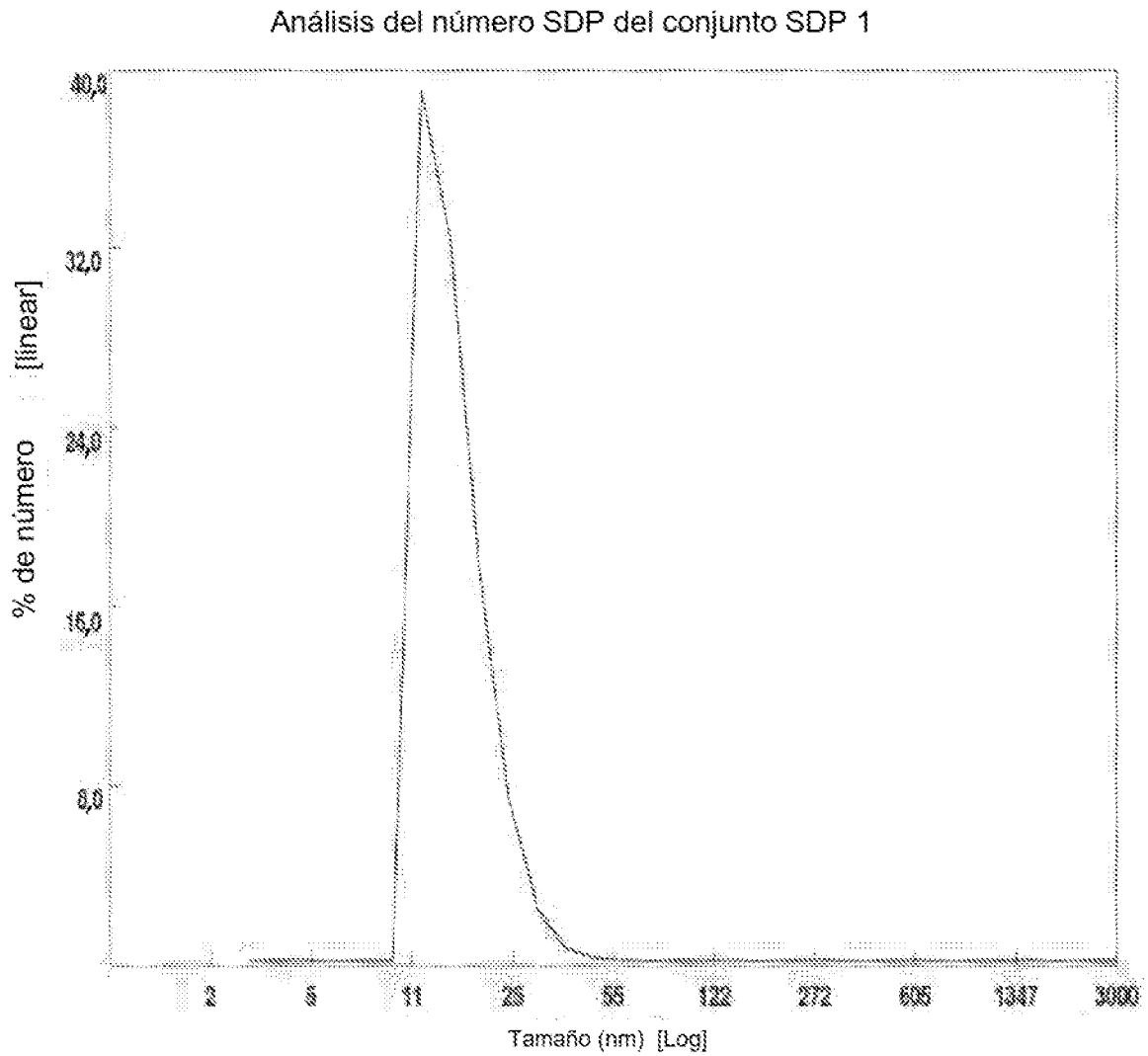


Figura 23A

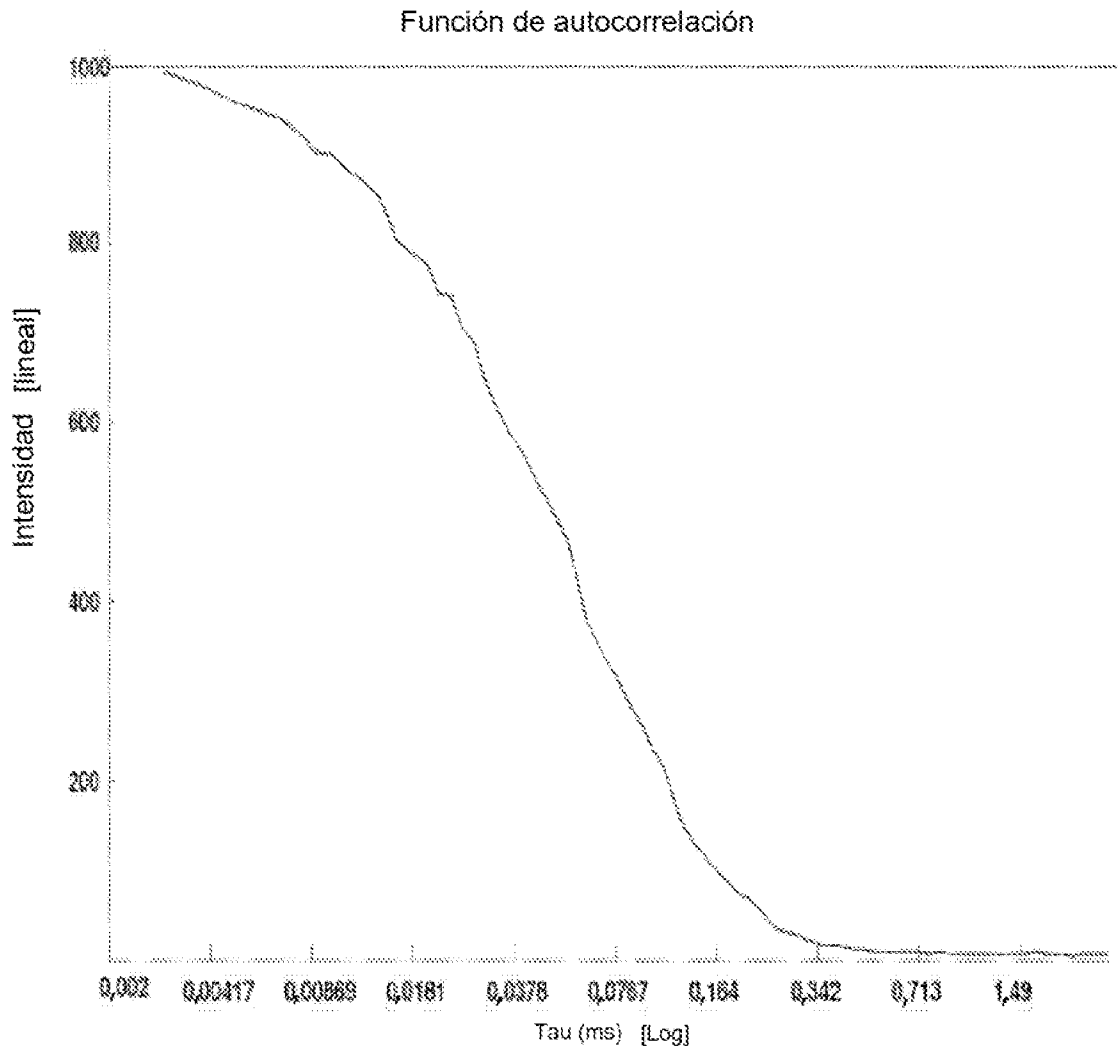


Figura 23B

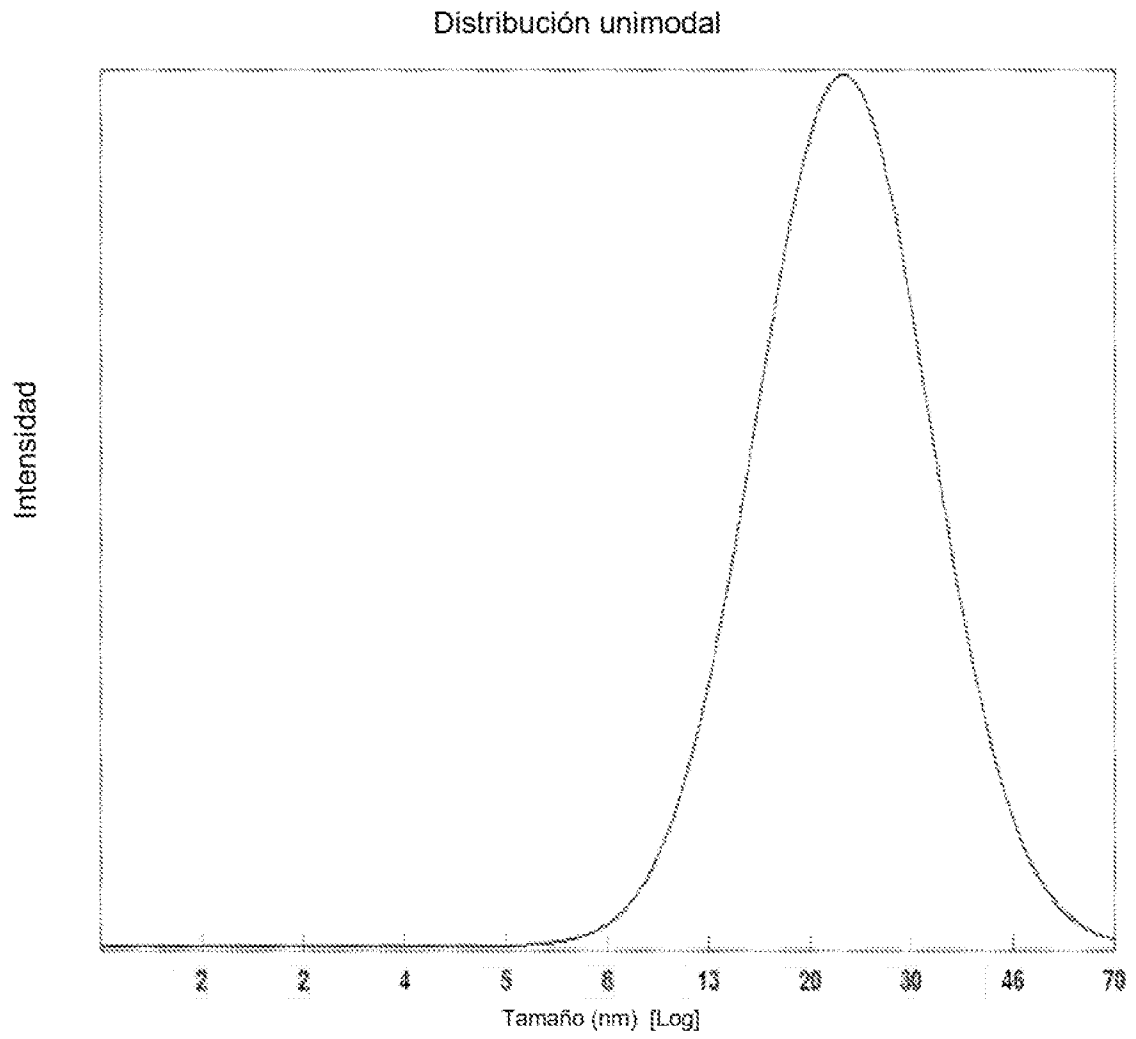


Figura 23C

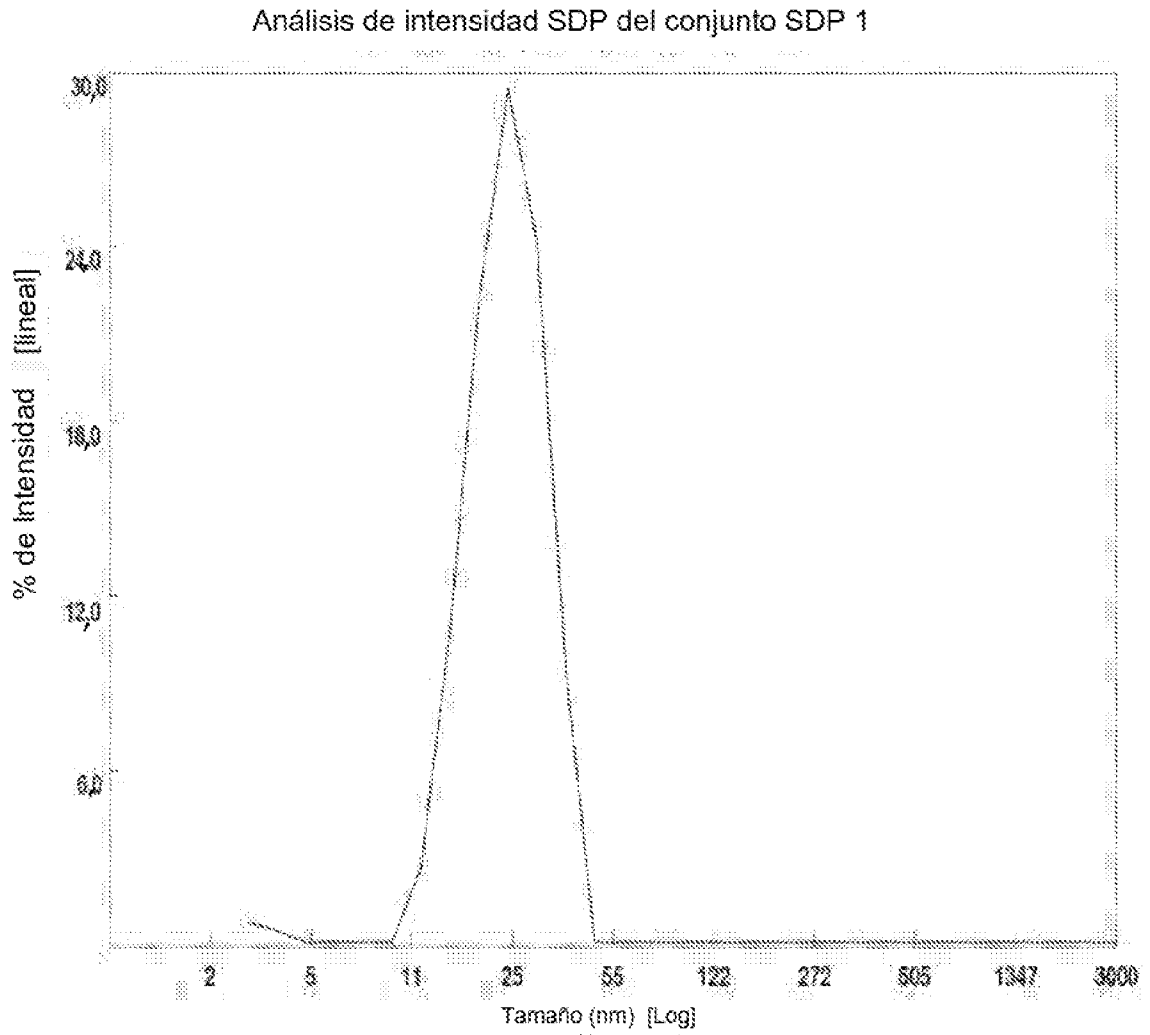


Figura 23D

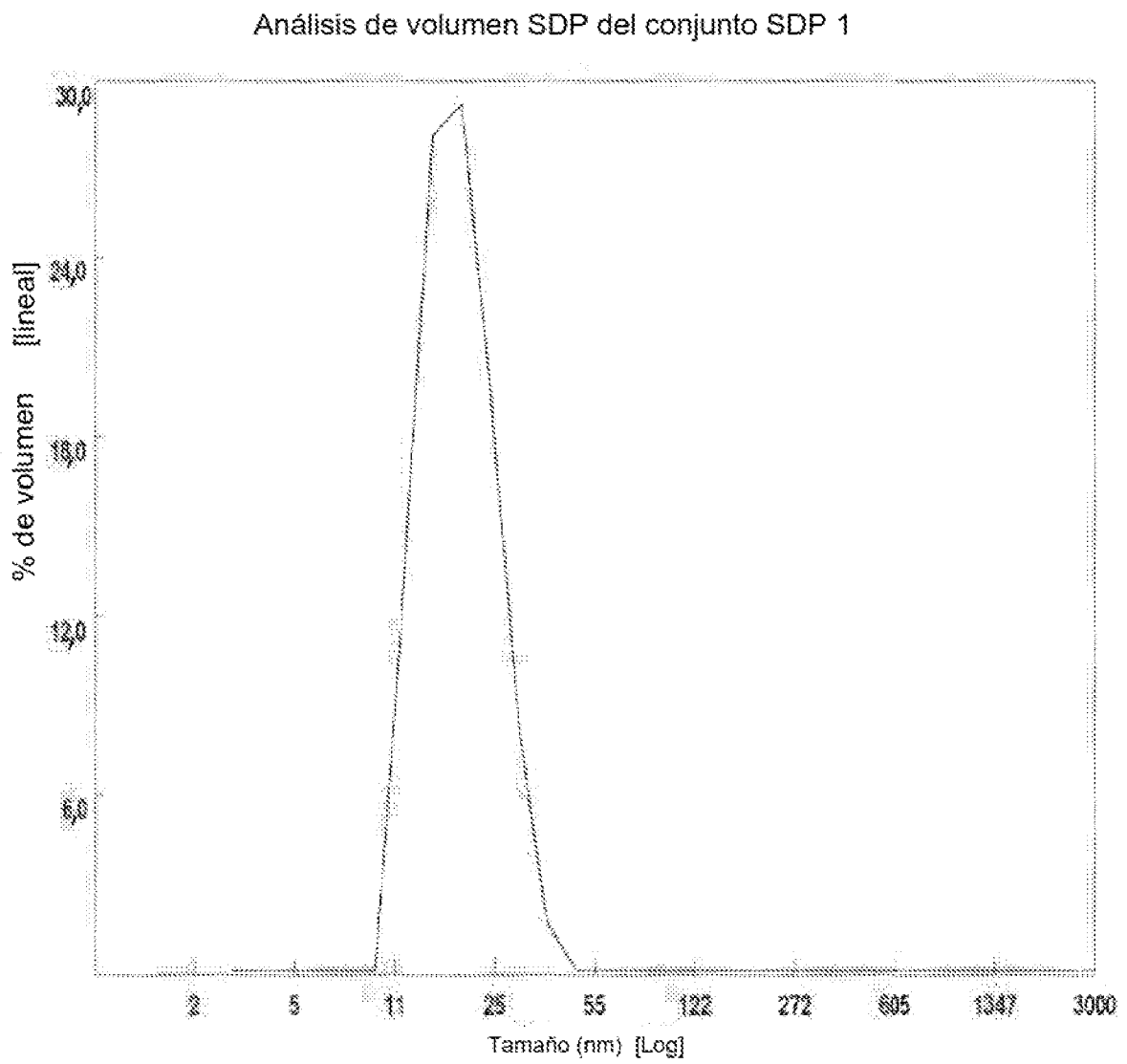


Figura 23E

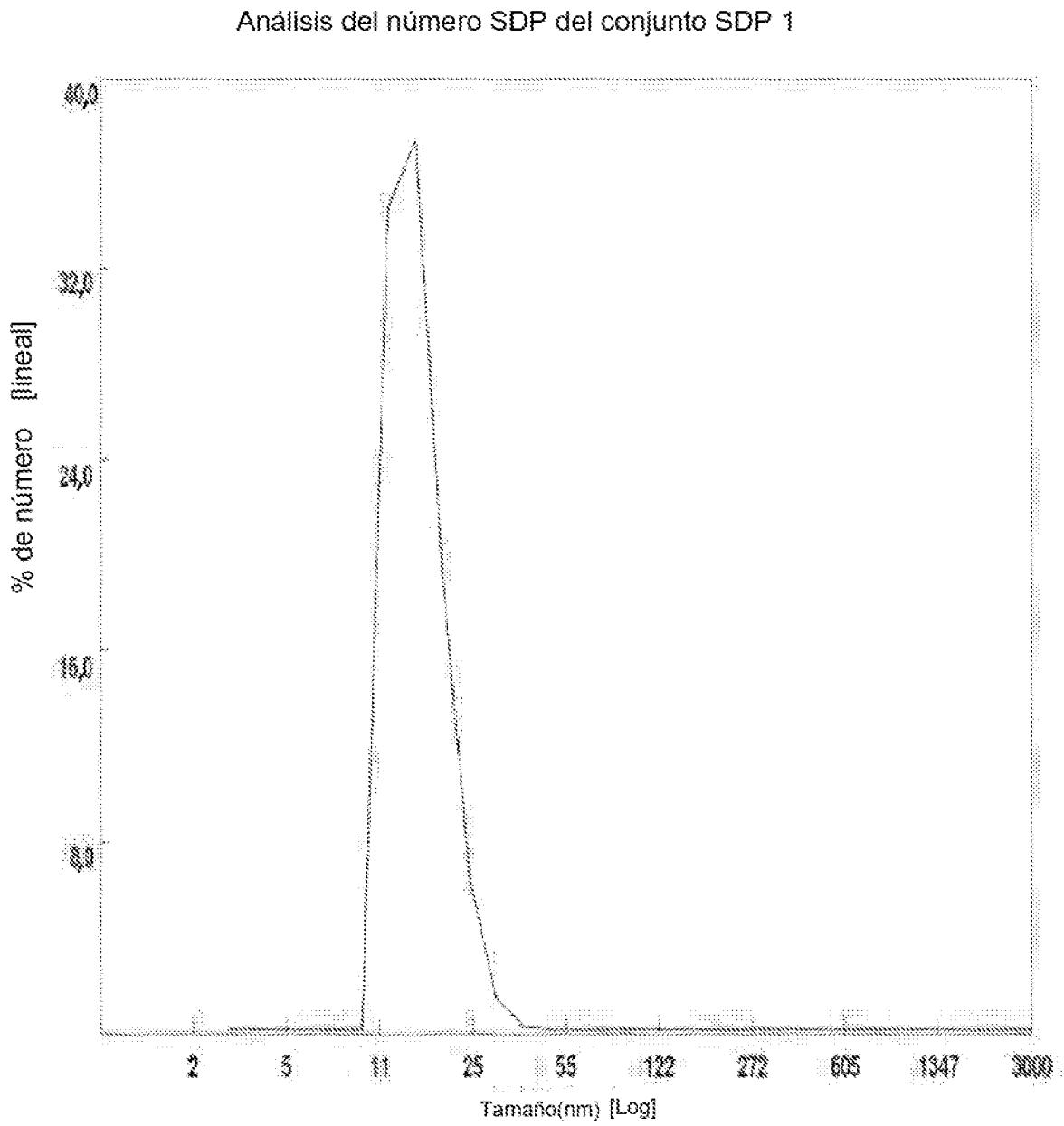


Figura 24A

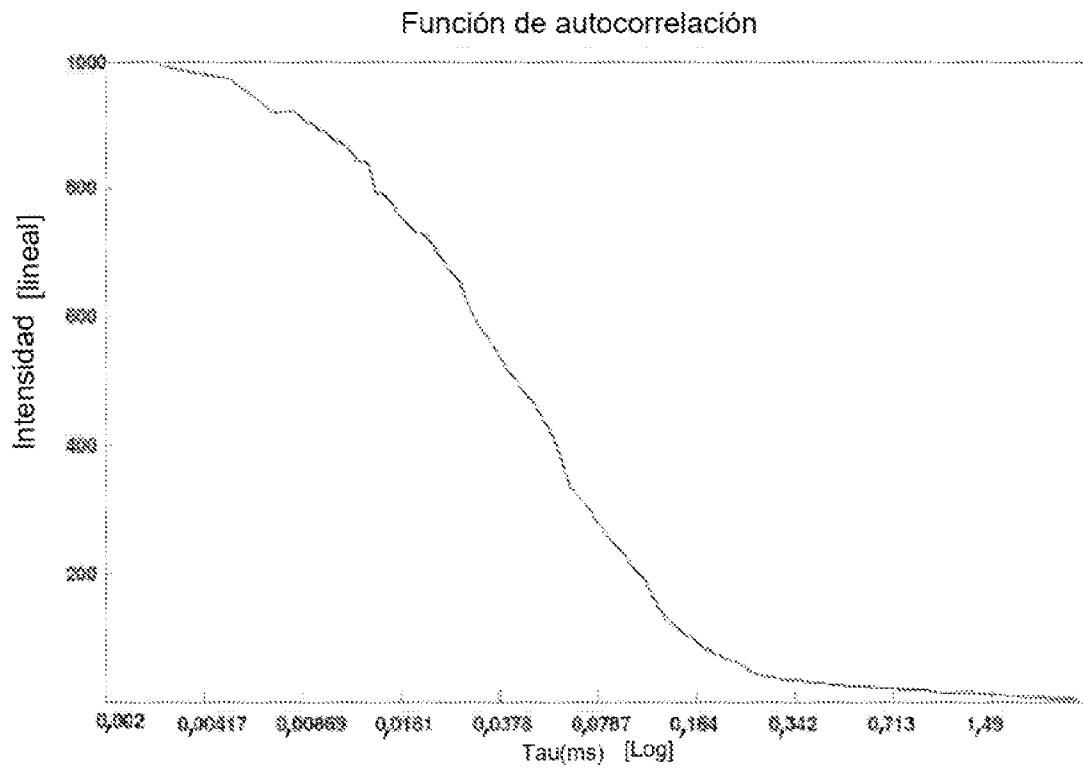


Figura 24B

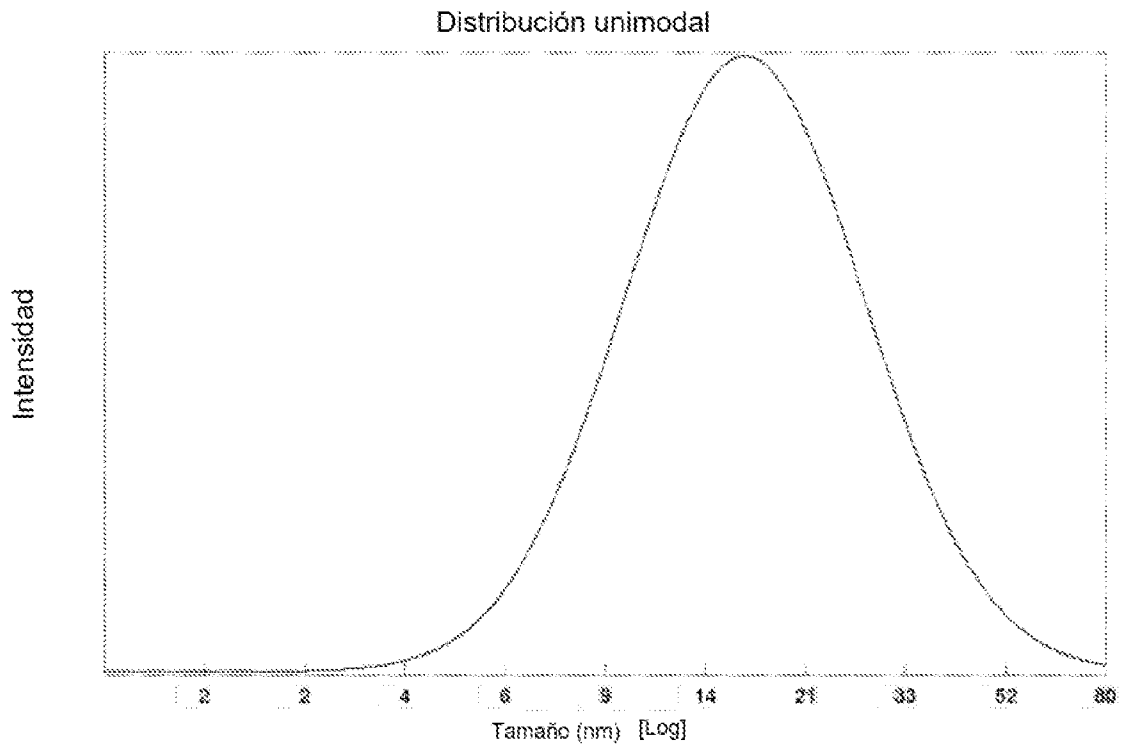


Figura 24C

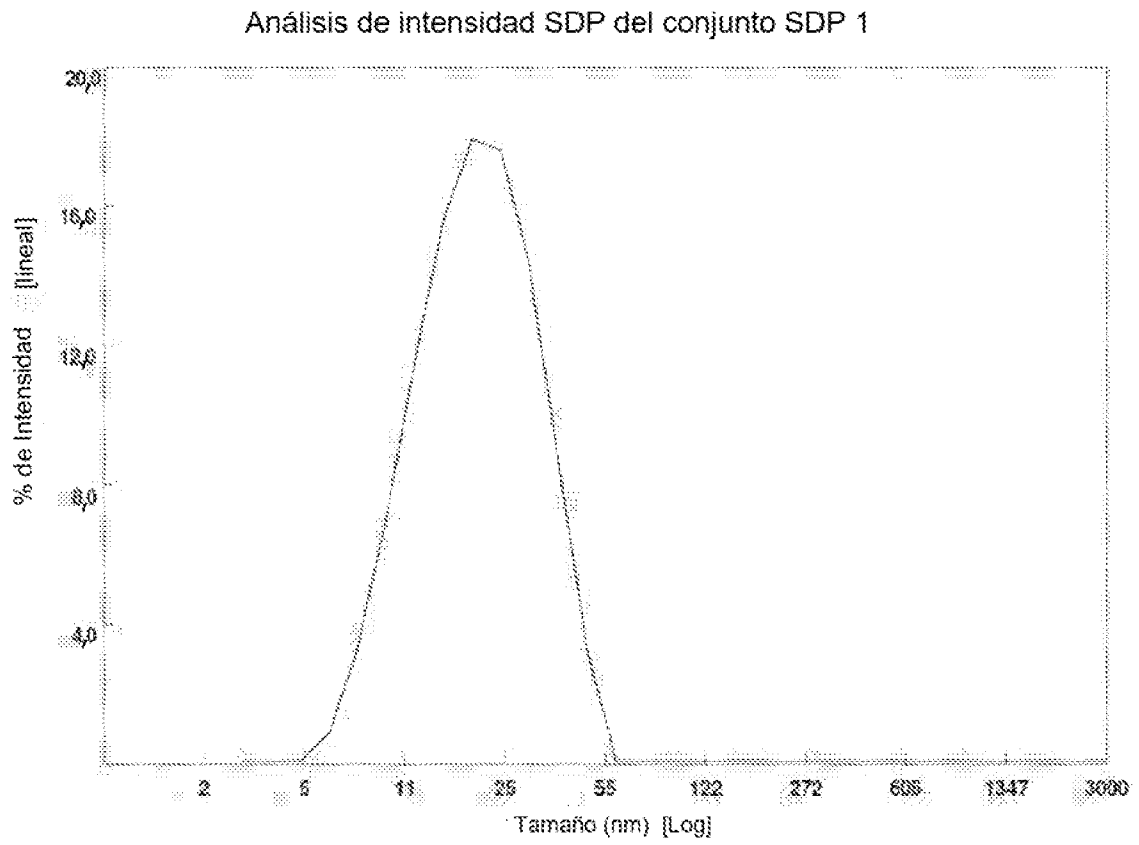


Figura 24D

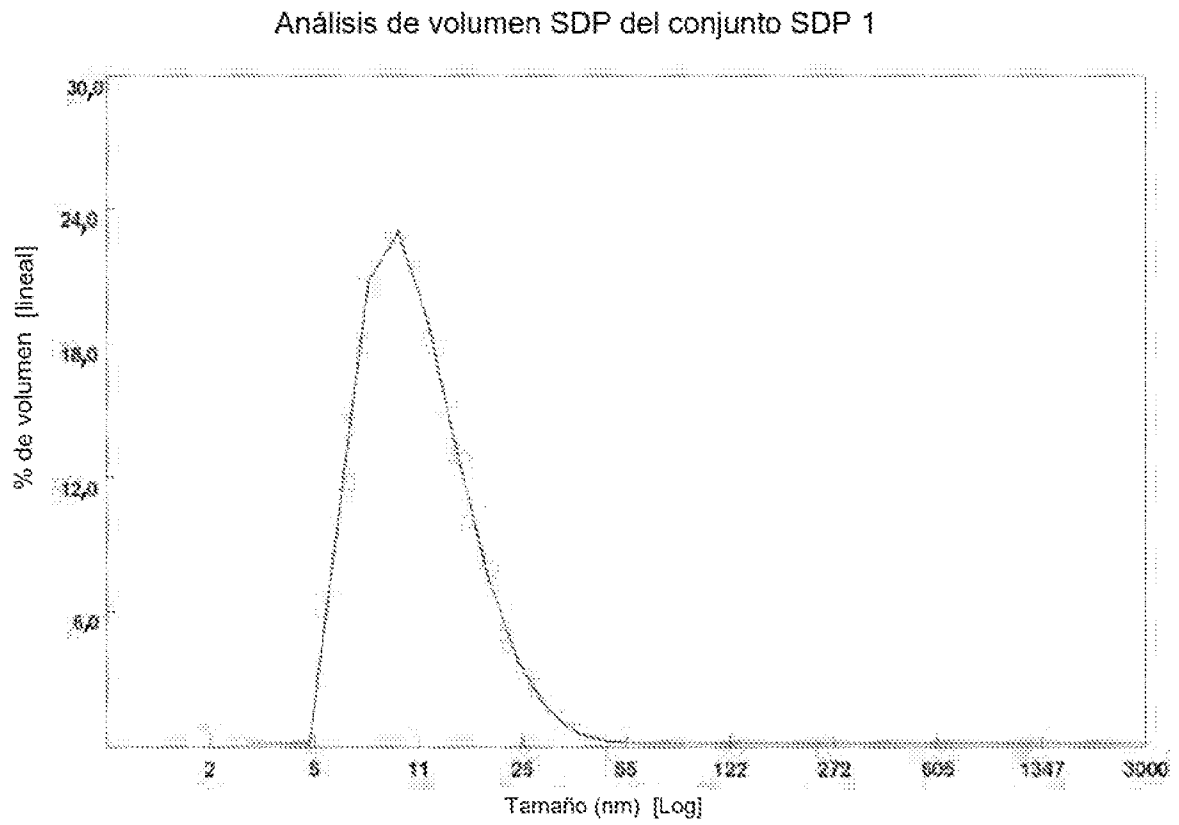


Figura 24E

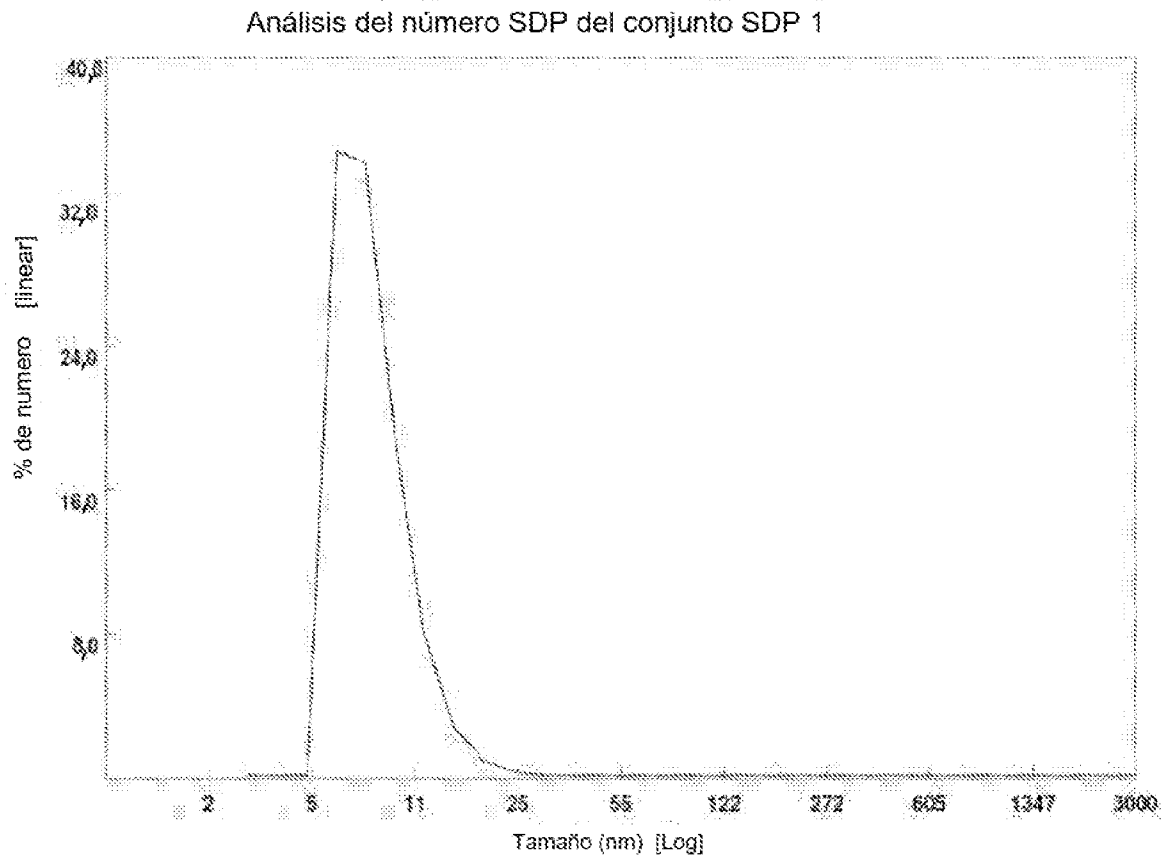


Figura 25

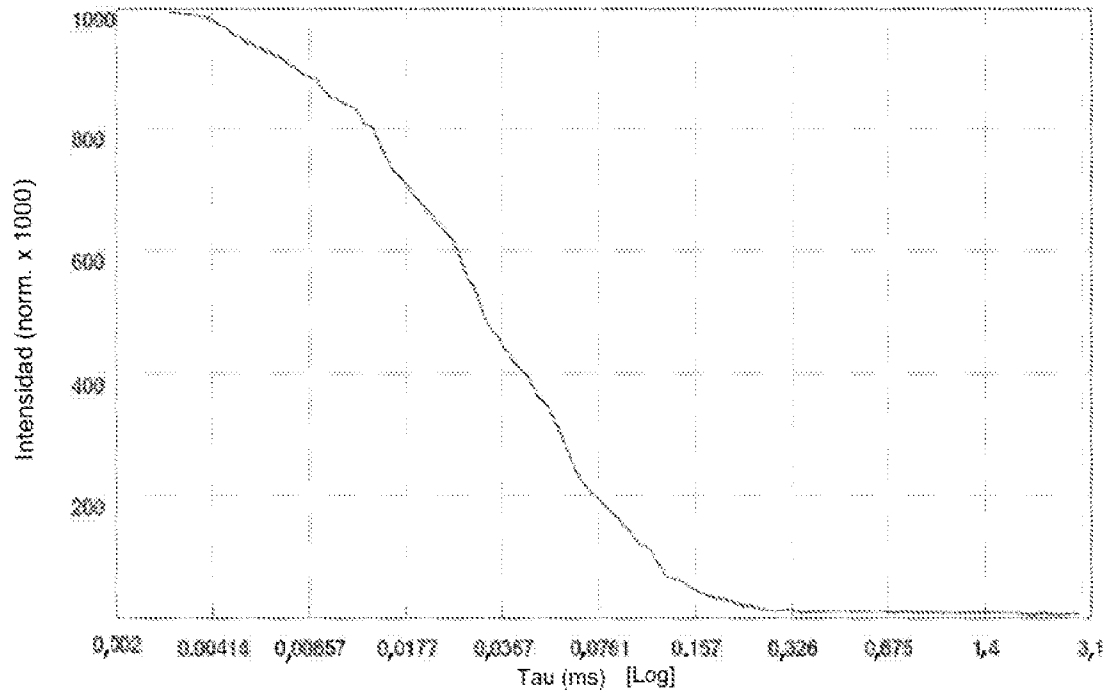


Figura 26A

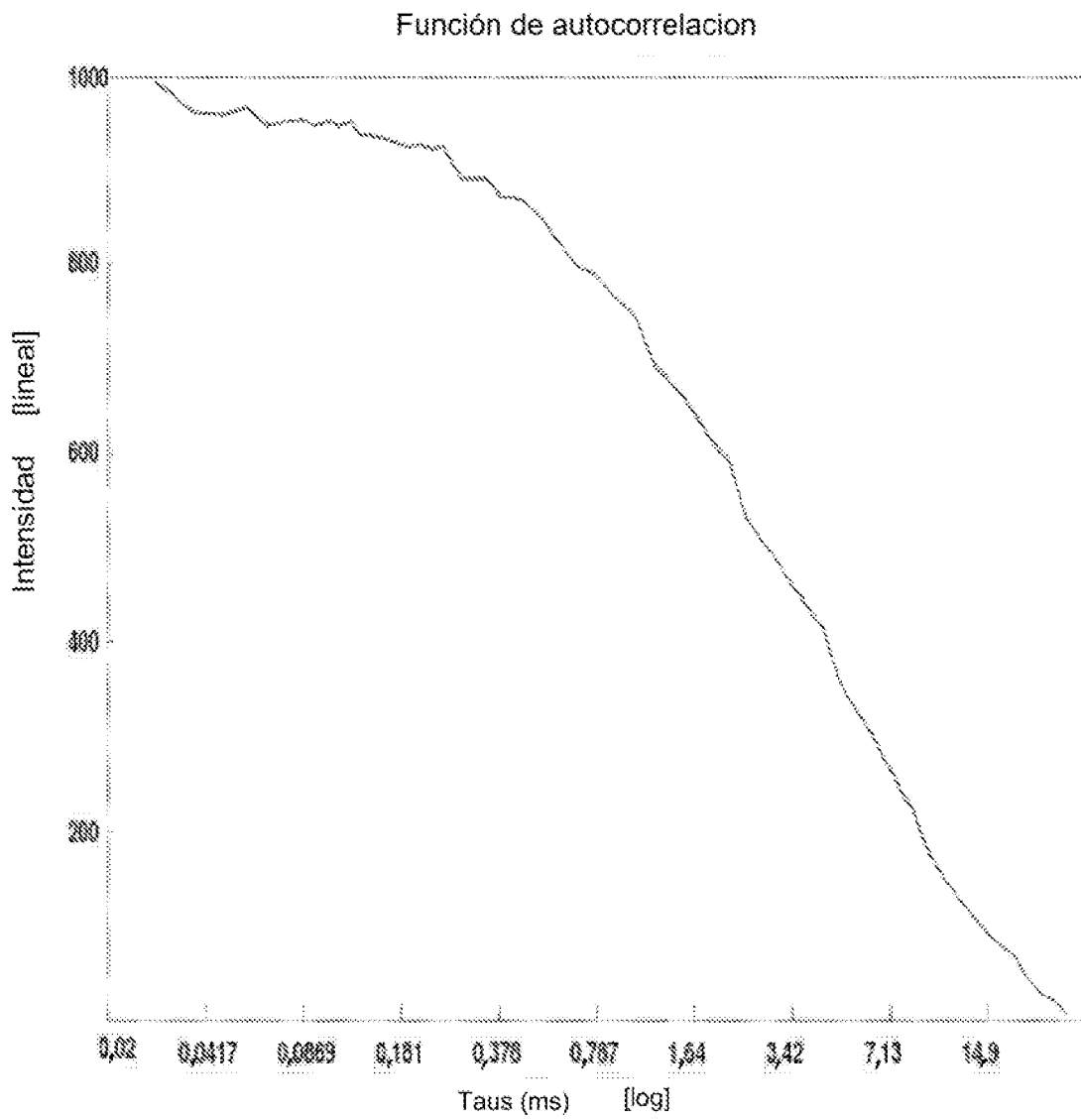


Figura 26B

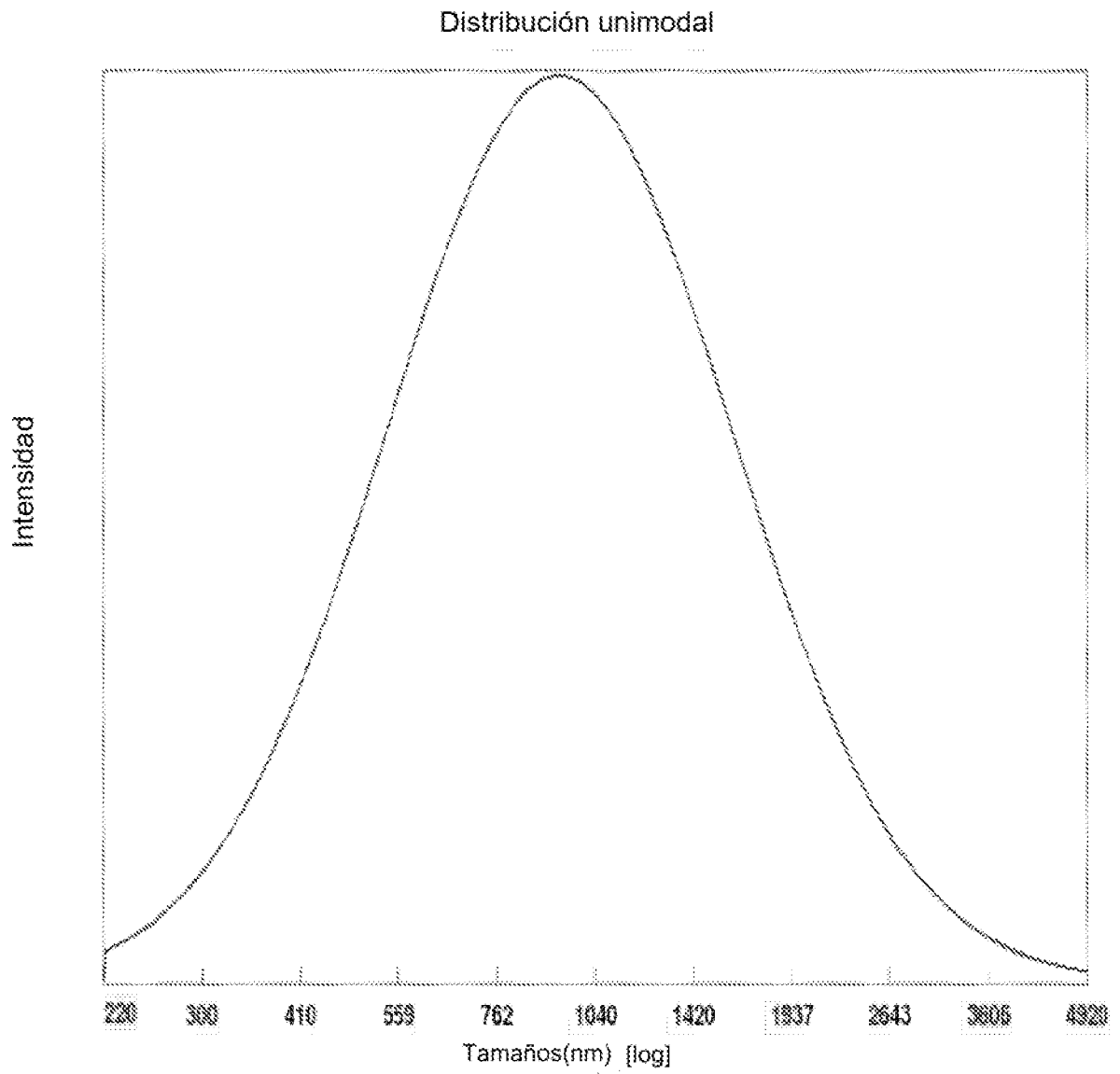


Figura 26C

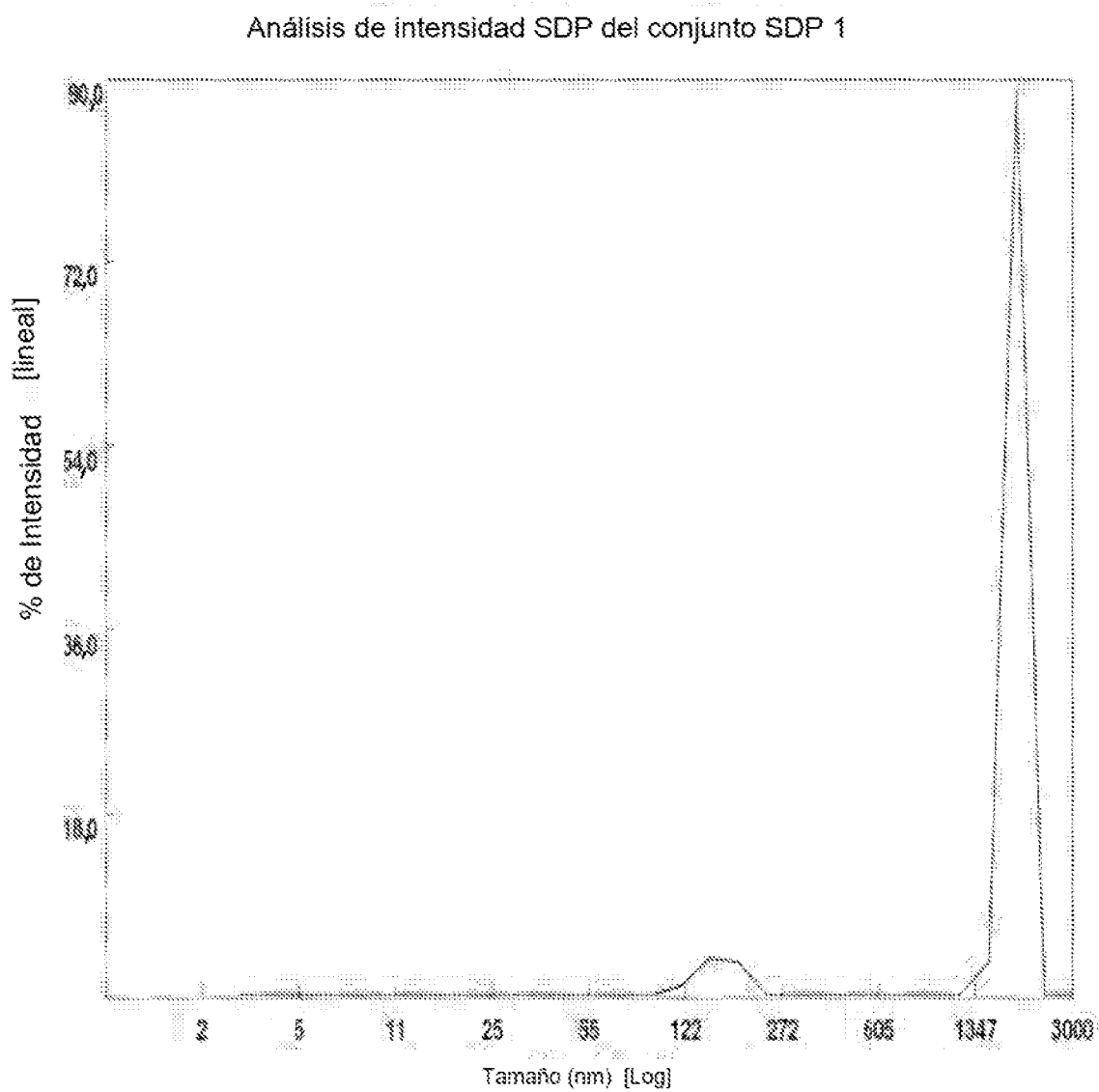


Figura 26D

Análisis de volumen SDP del conjunto SDP 1

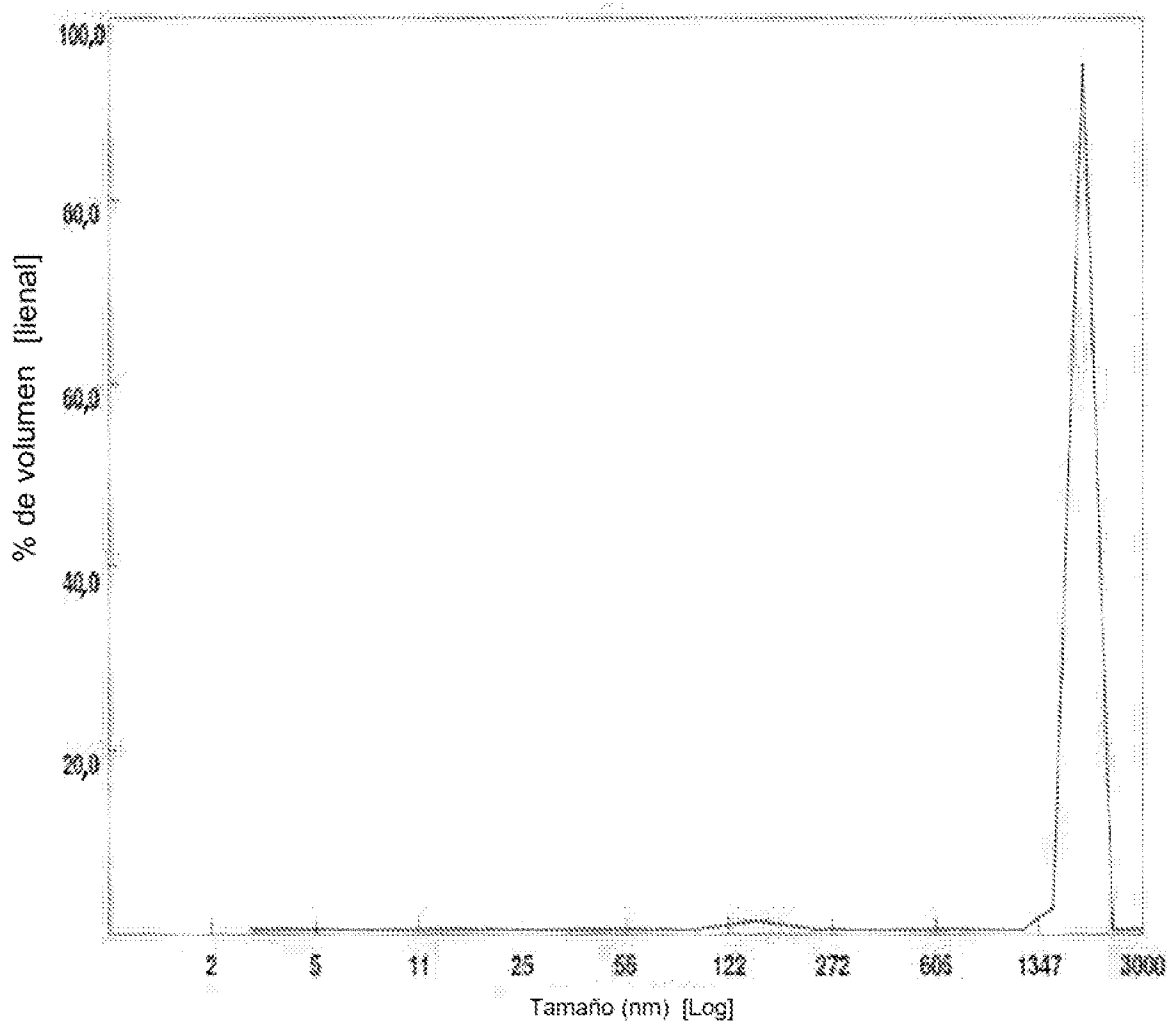


Figura 26E

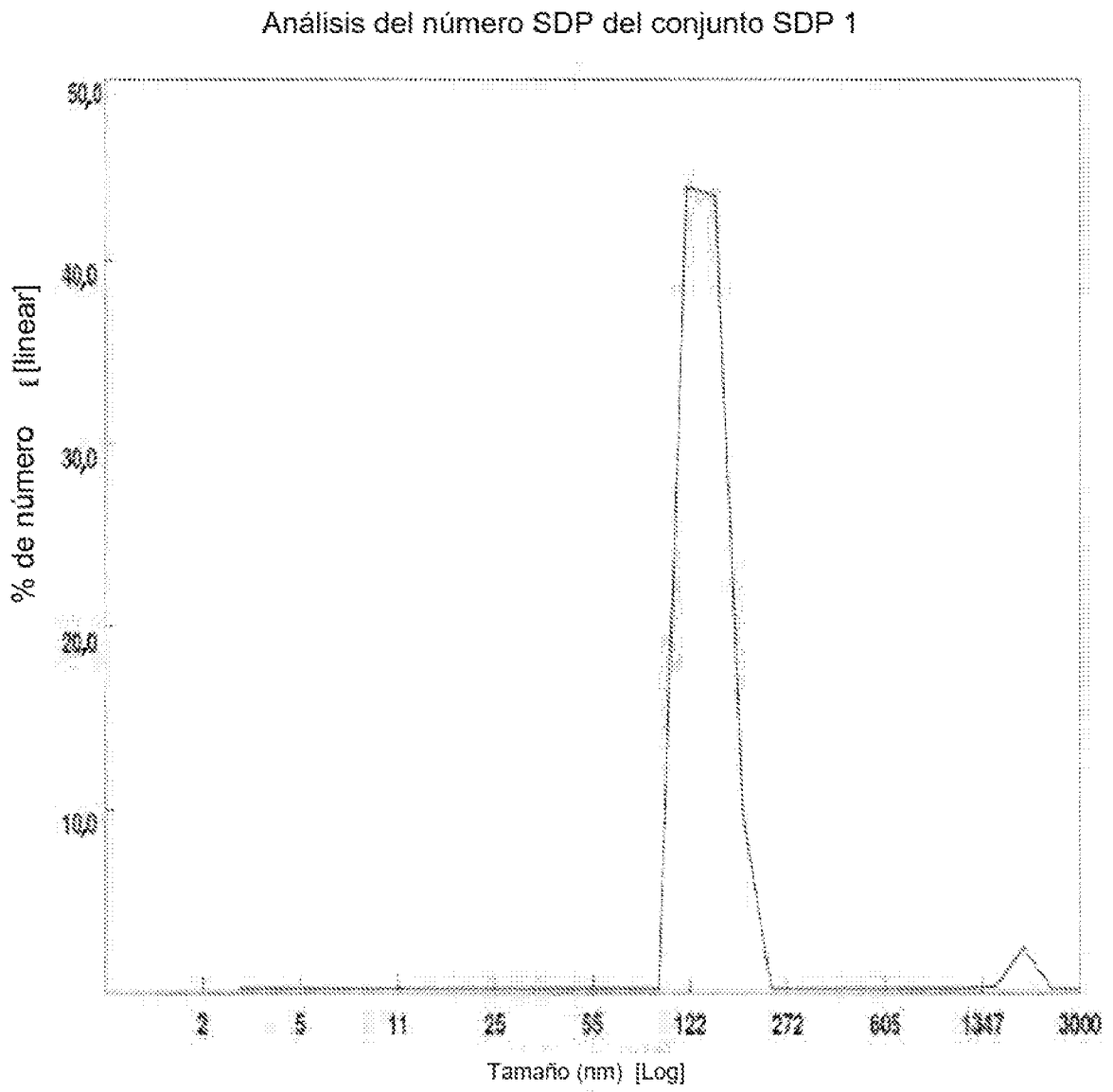


Figura 27A

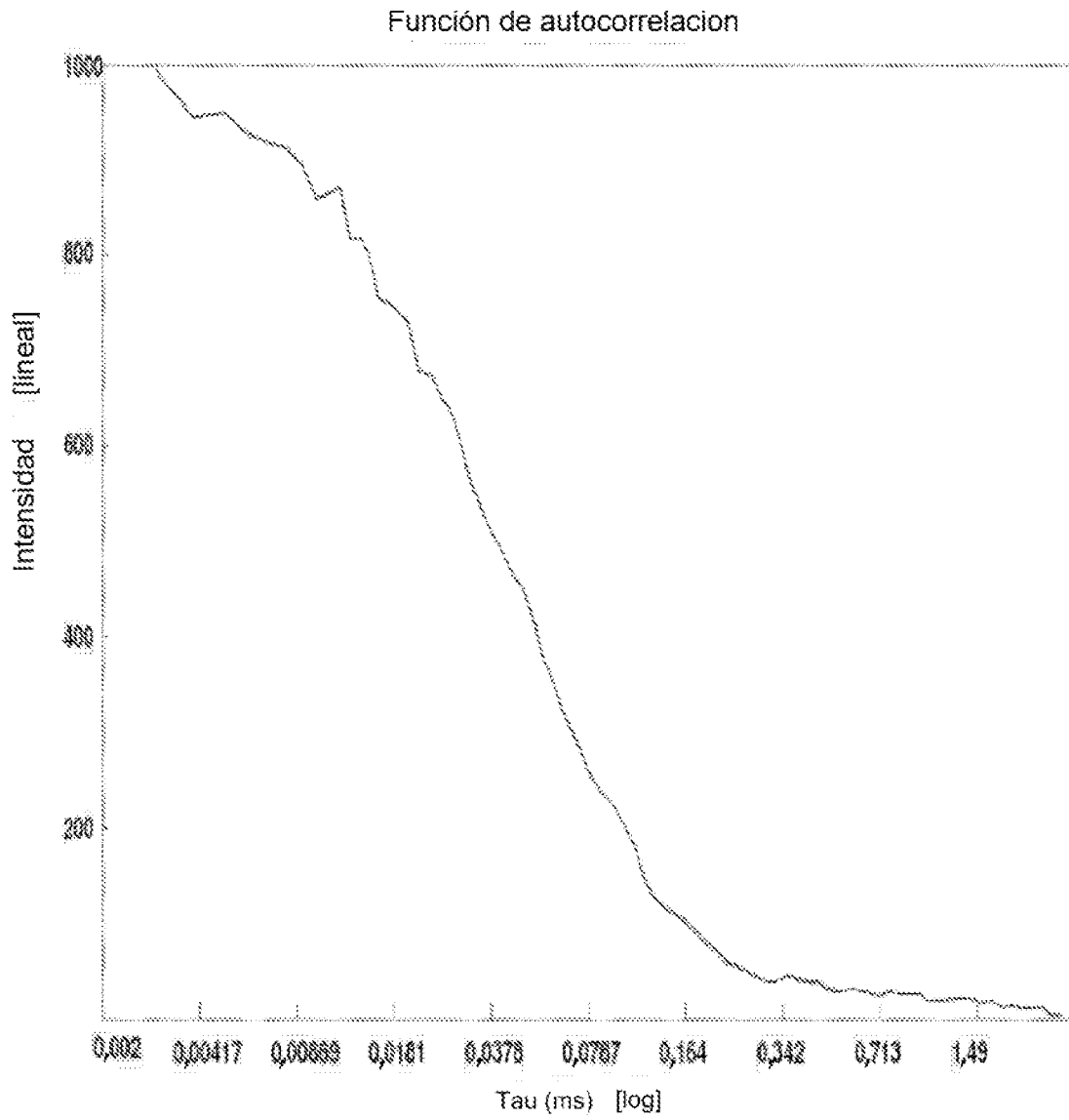


Figura 27B

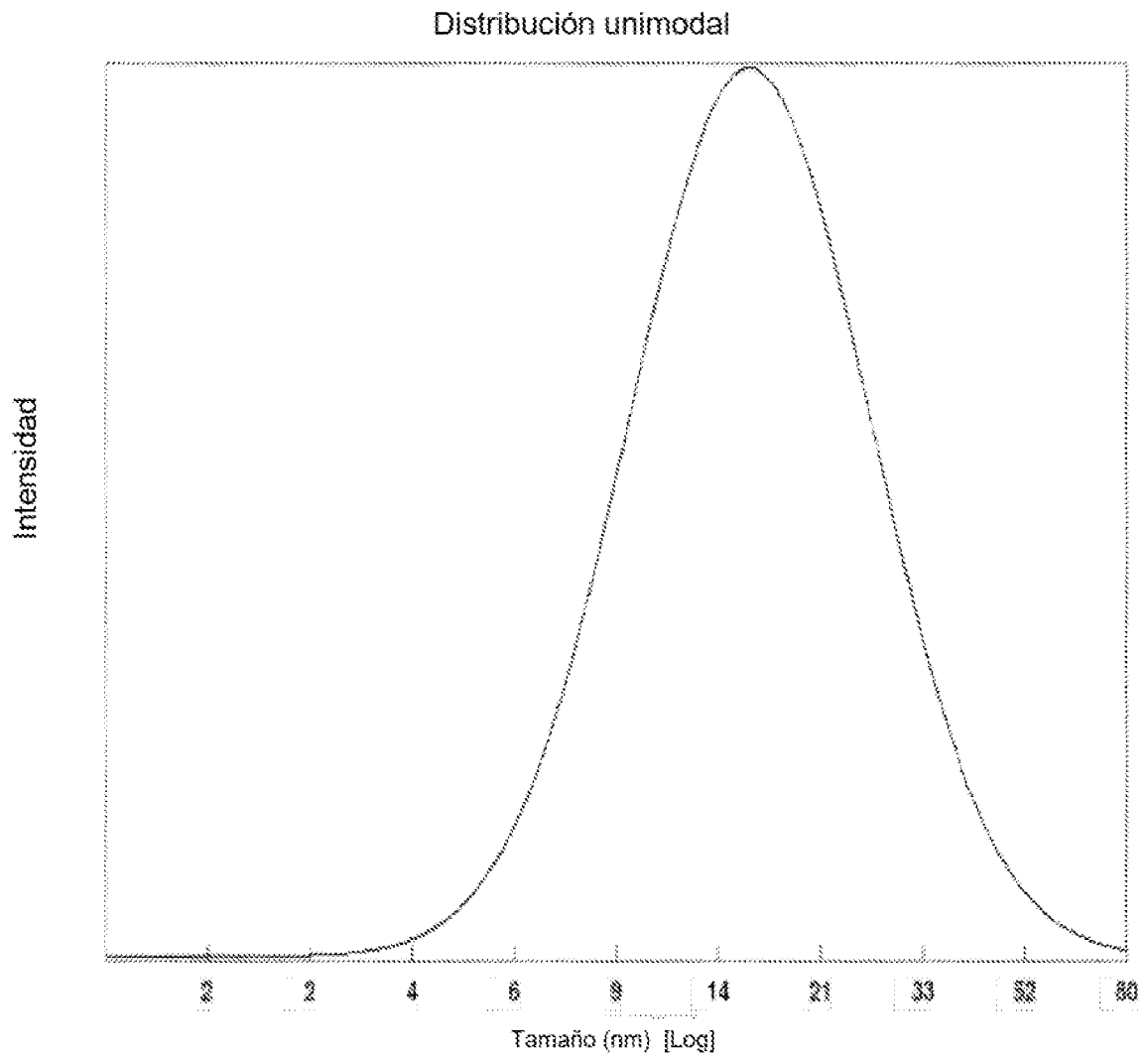


Figura 27C

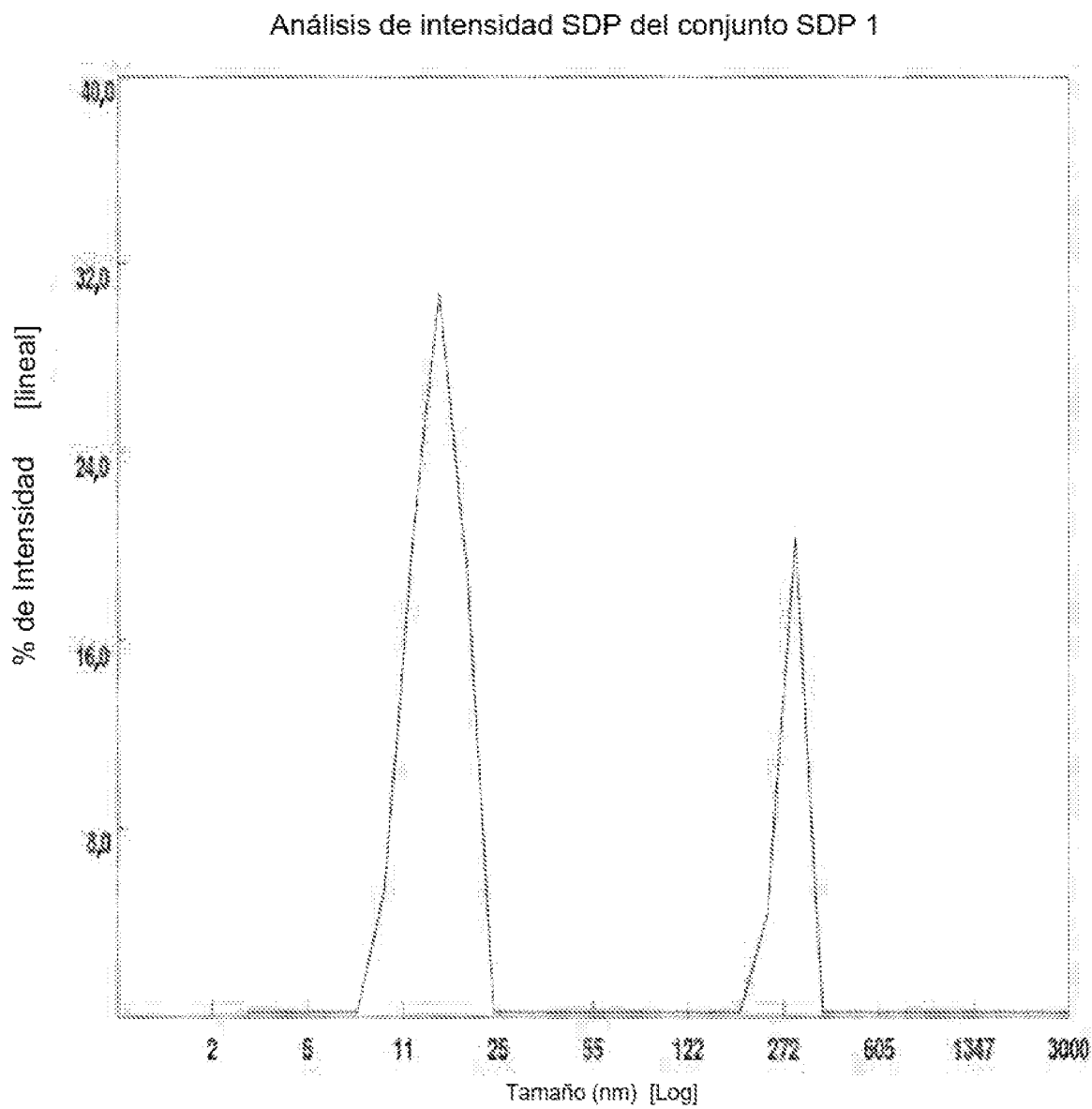


Figura 27D

Análisis de volumen SDP del conjunto SDP 1

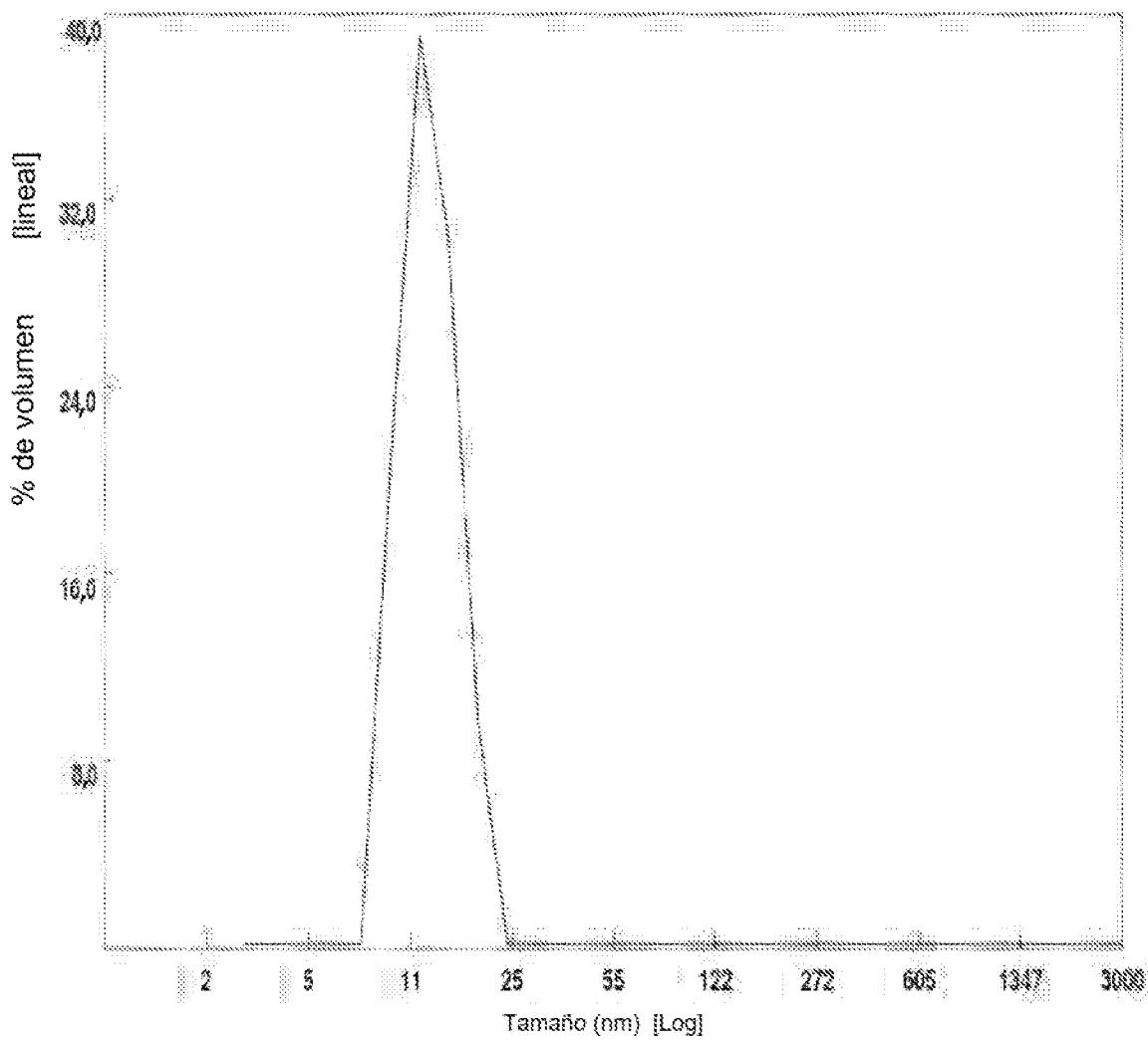


Figura 27E

Análisis del número SDP del conjunto SDP 1

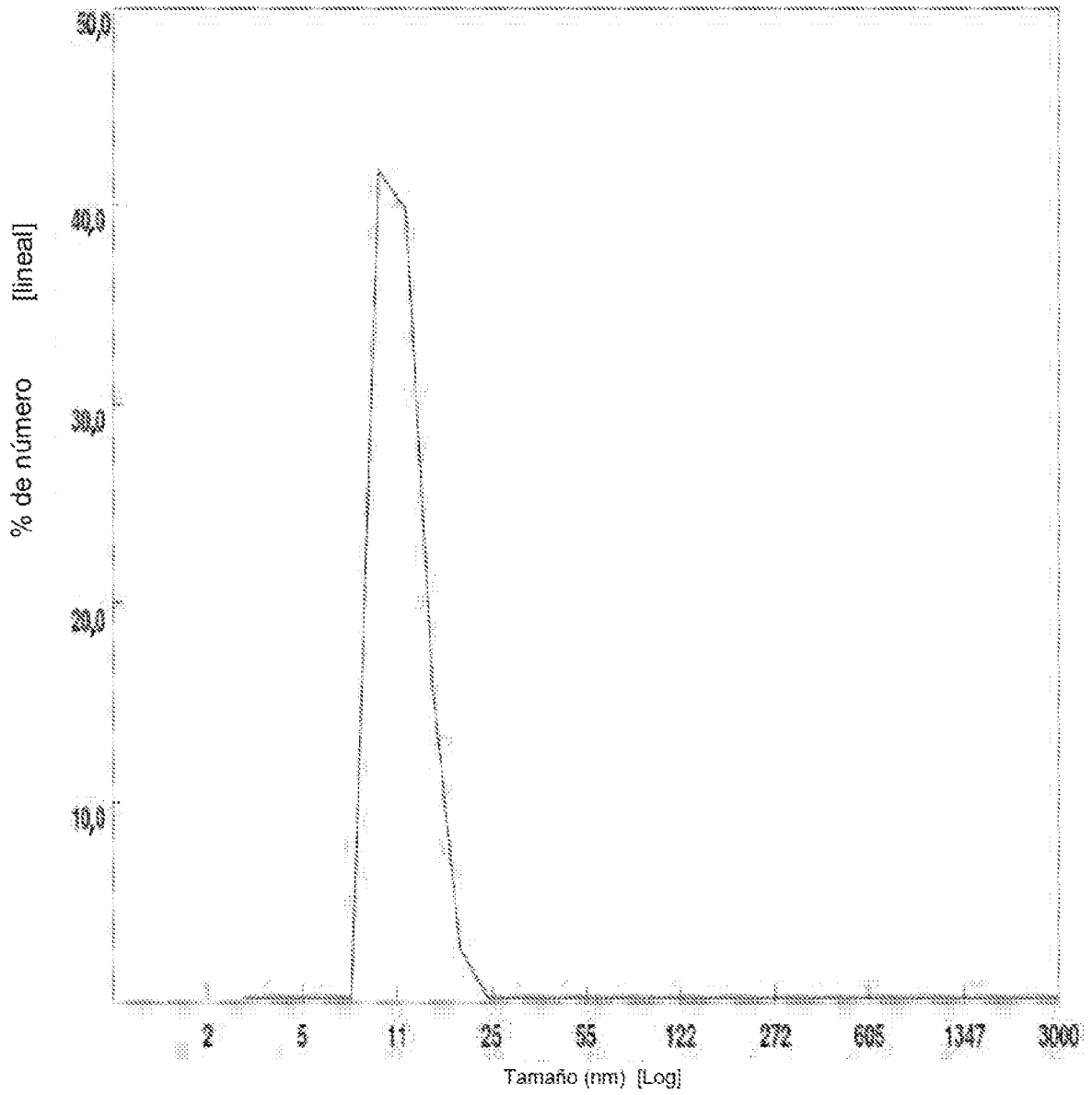


Figura 28A

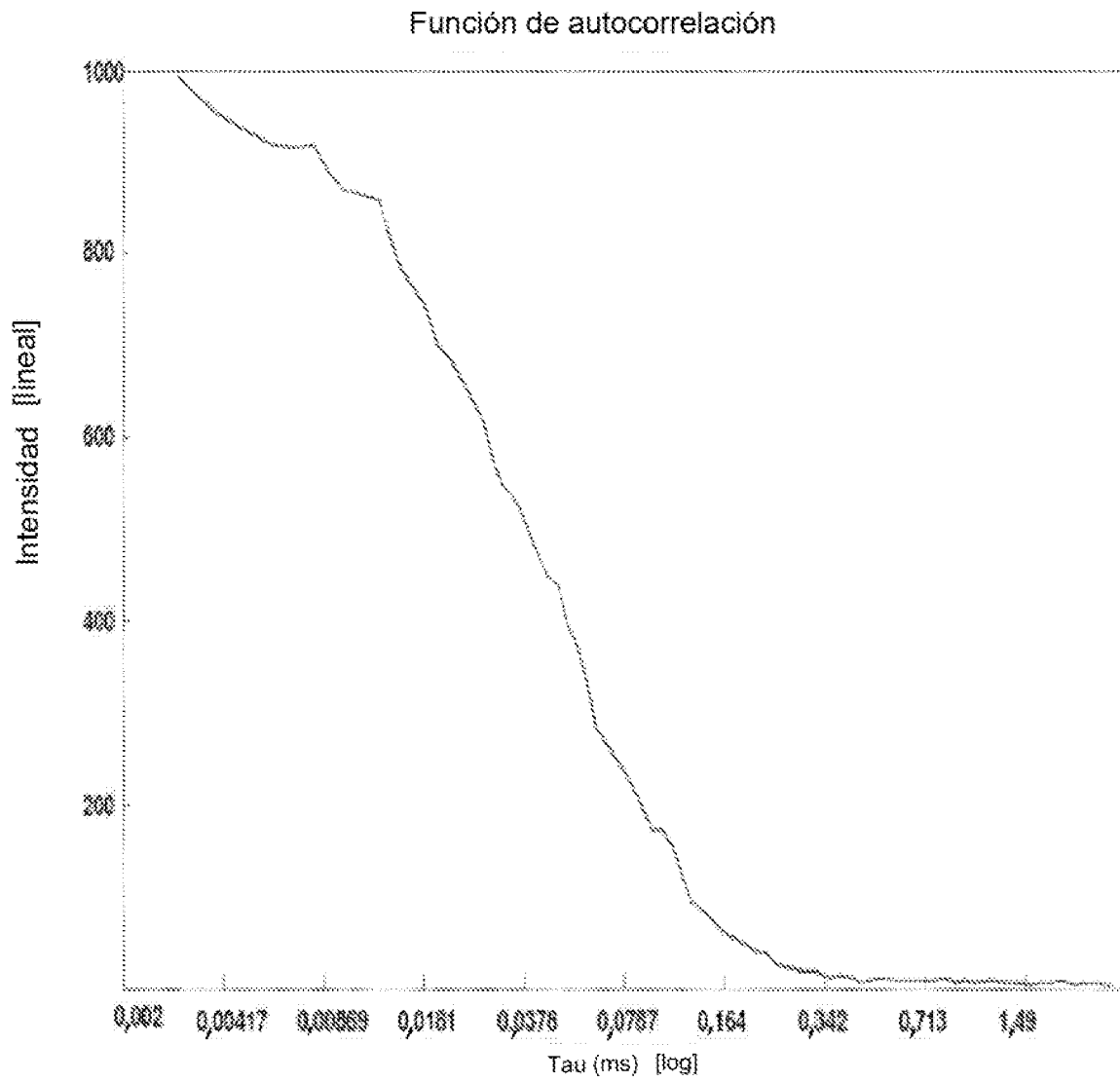


Figura 28B

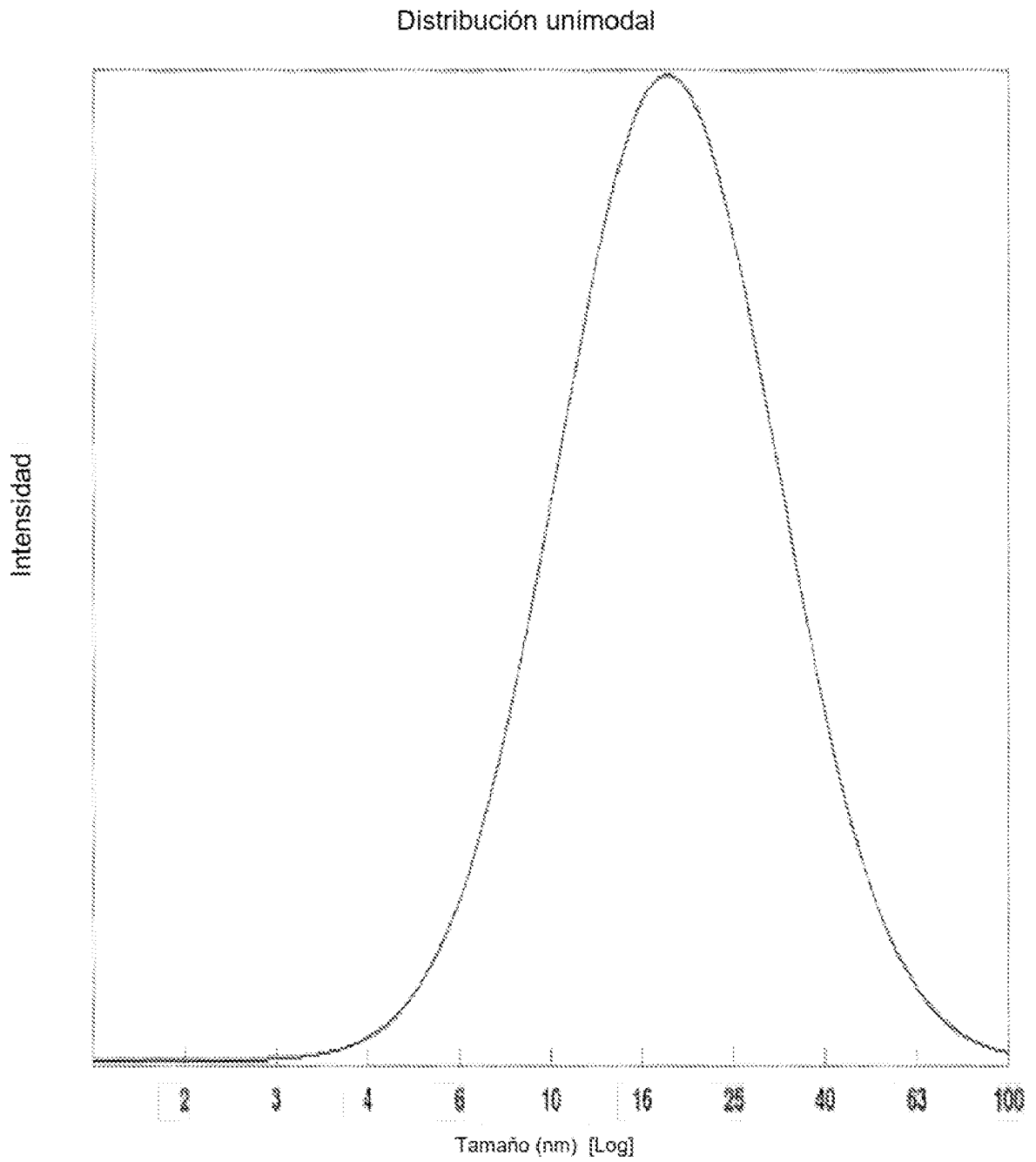


Figura 28C

Análisis de intensidad SDP del conjunto SDP 1

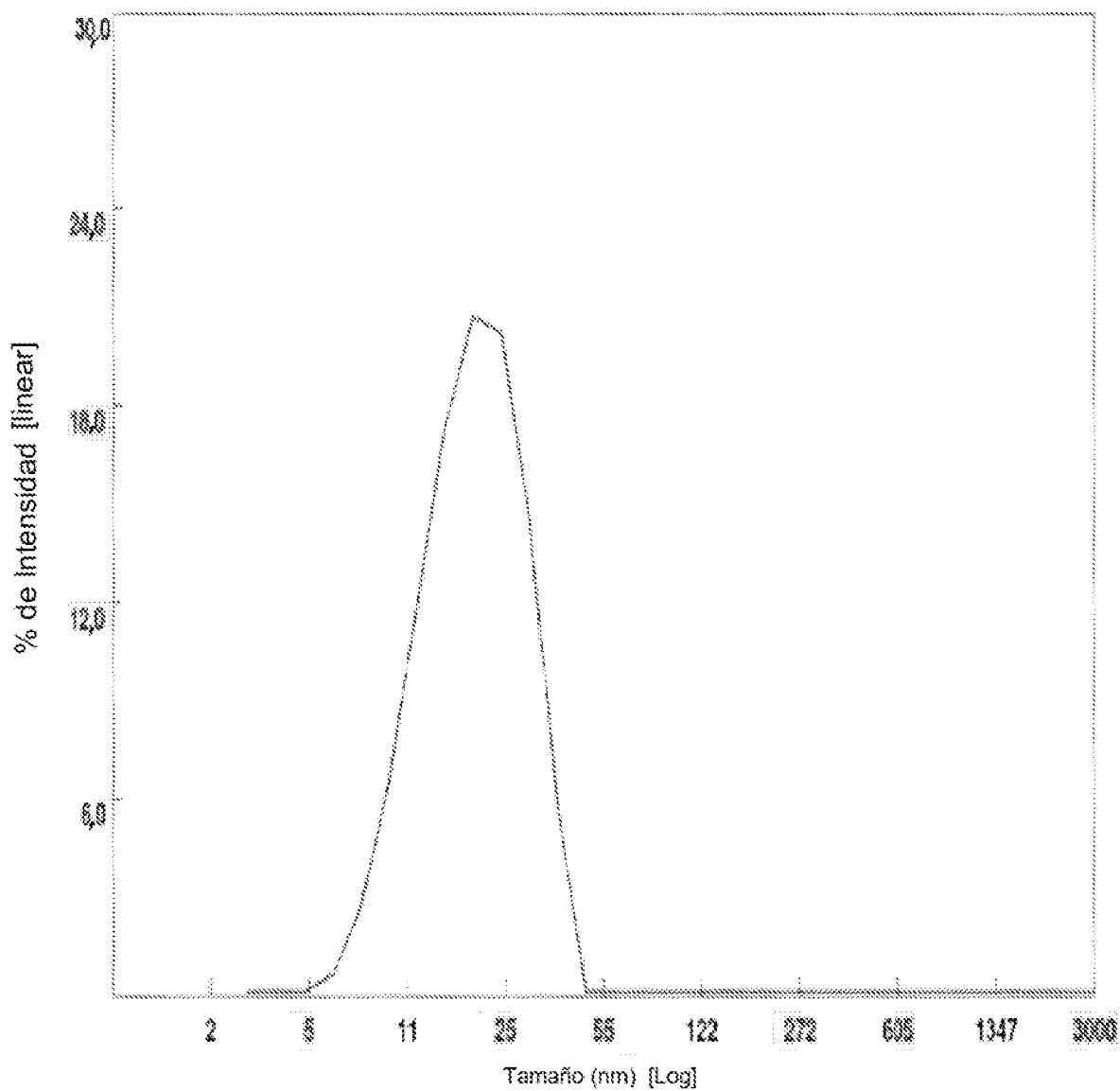


Figura 28D

Análisis de volumen SDP del conjunto SDP 1

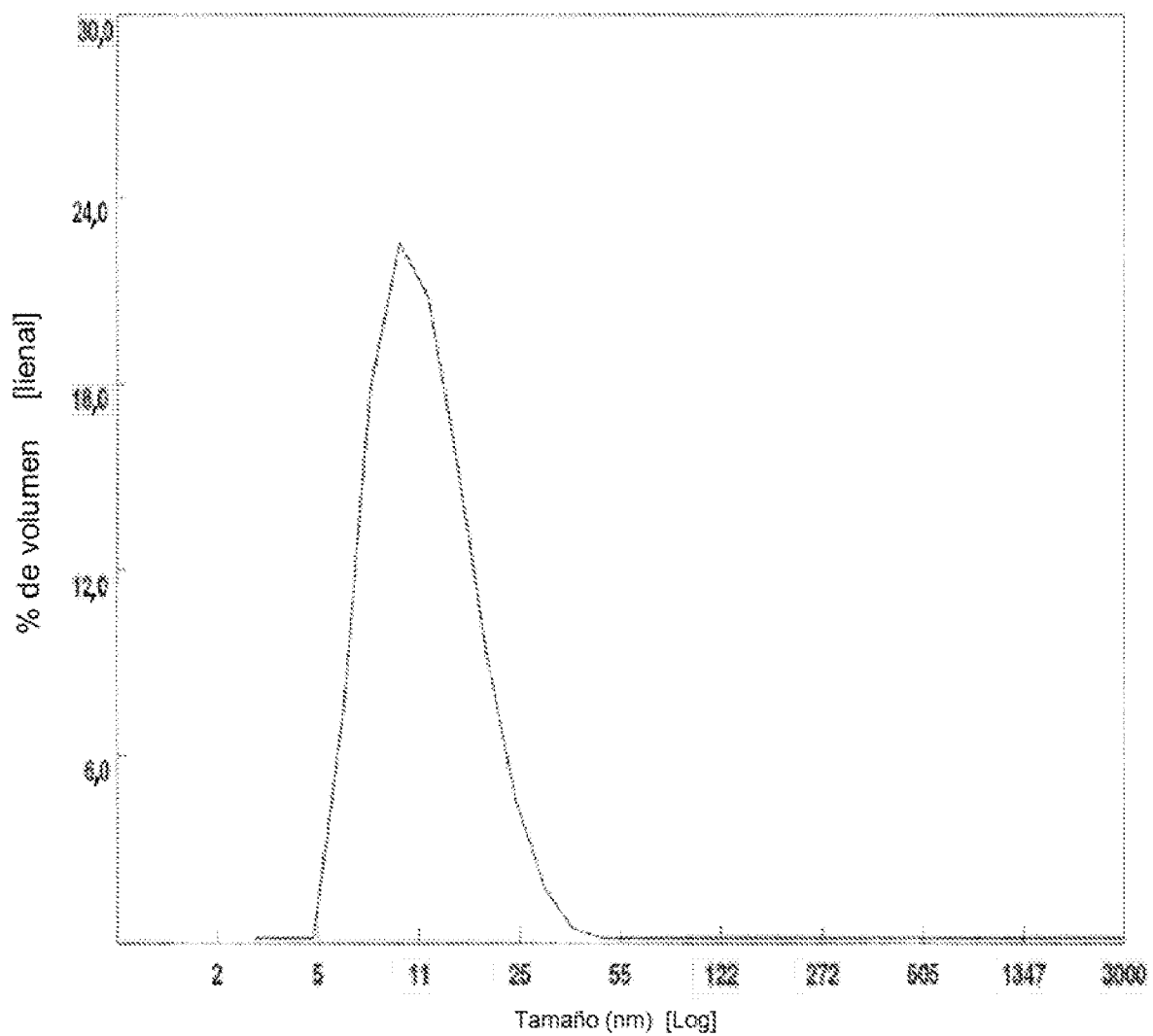


Figura 28E

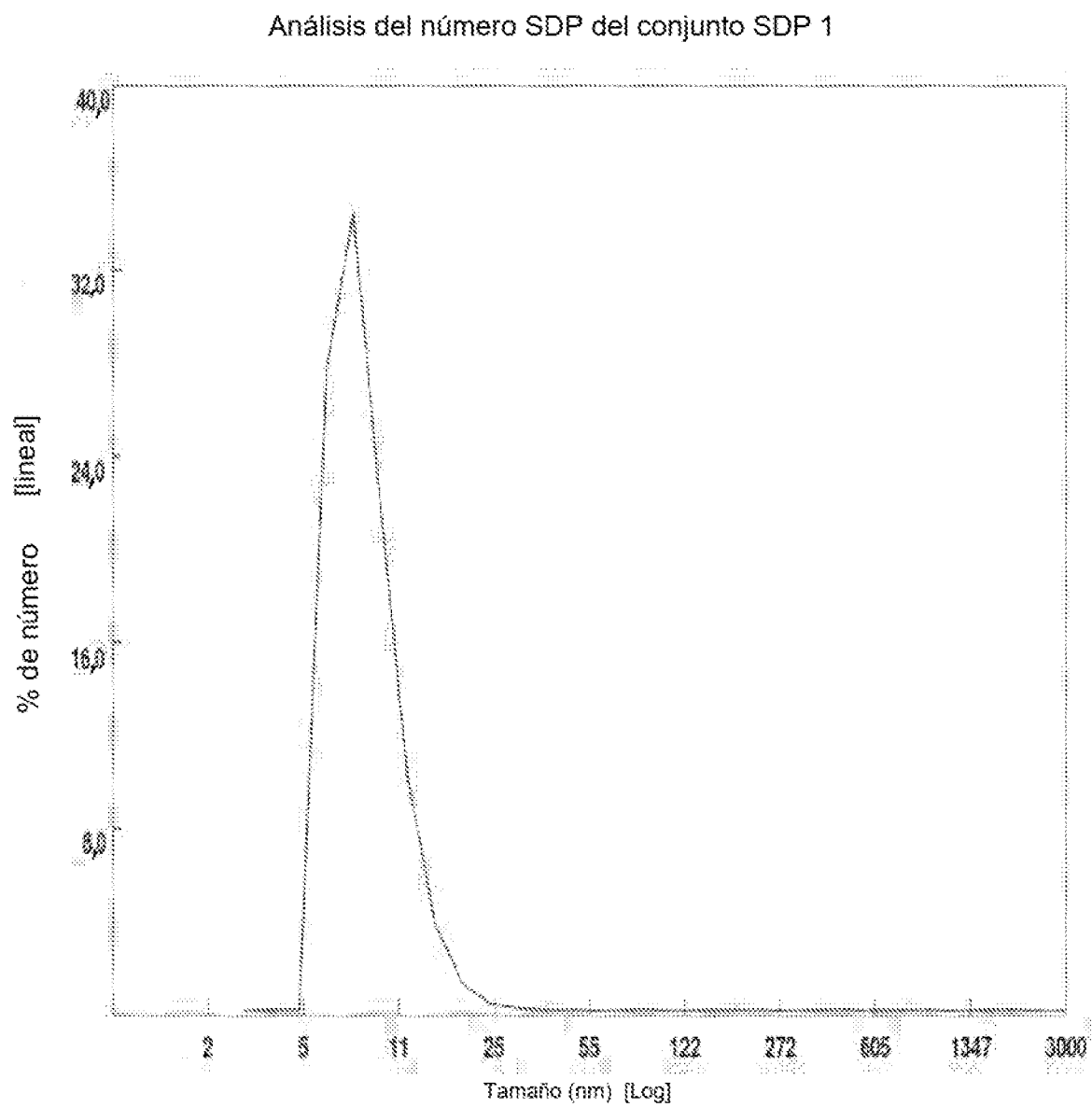


Figura 29A

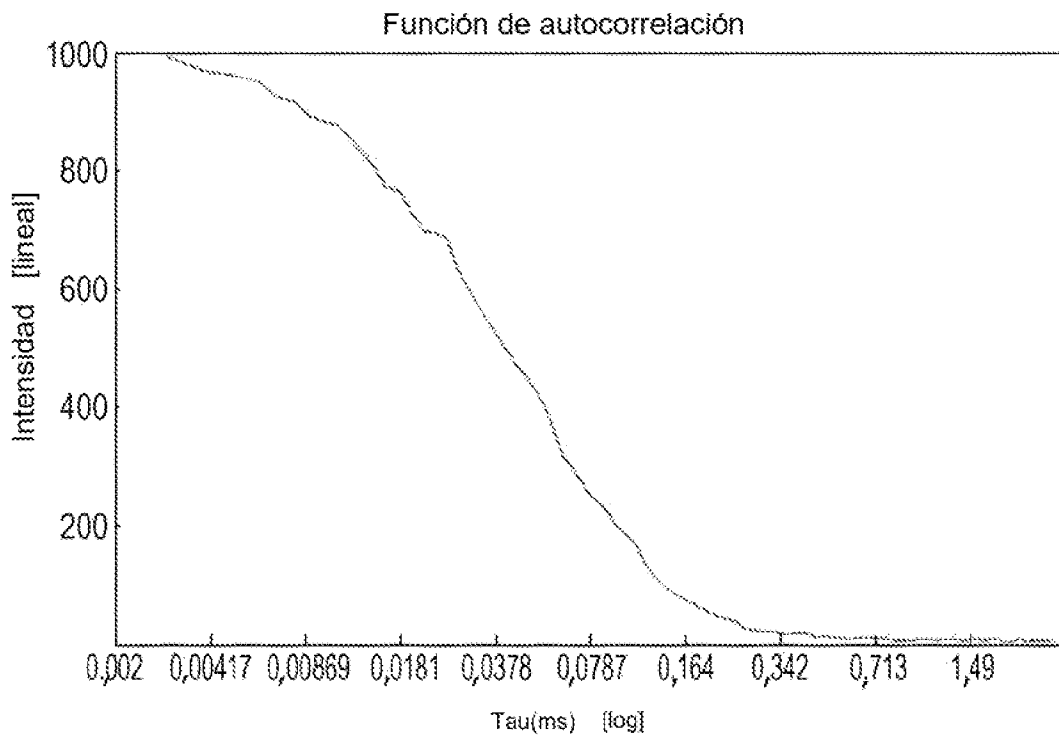


Figura 29B

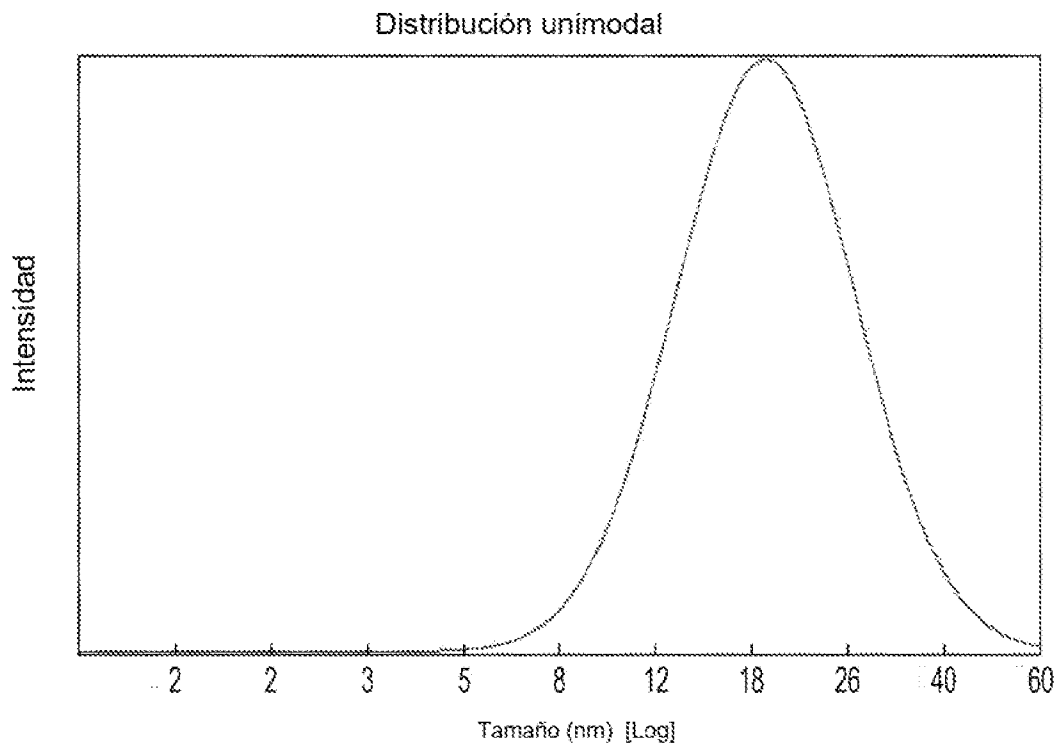


Figura 29C

Análisis del número SDP del conjunto SDP 1

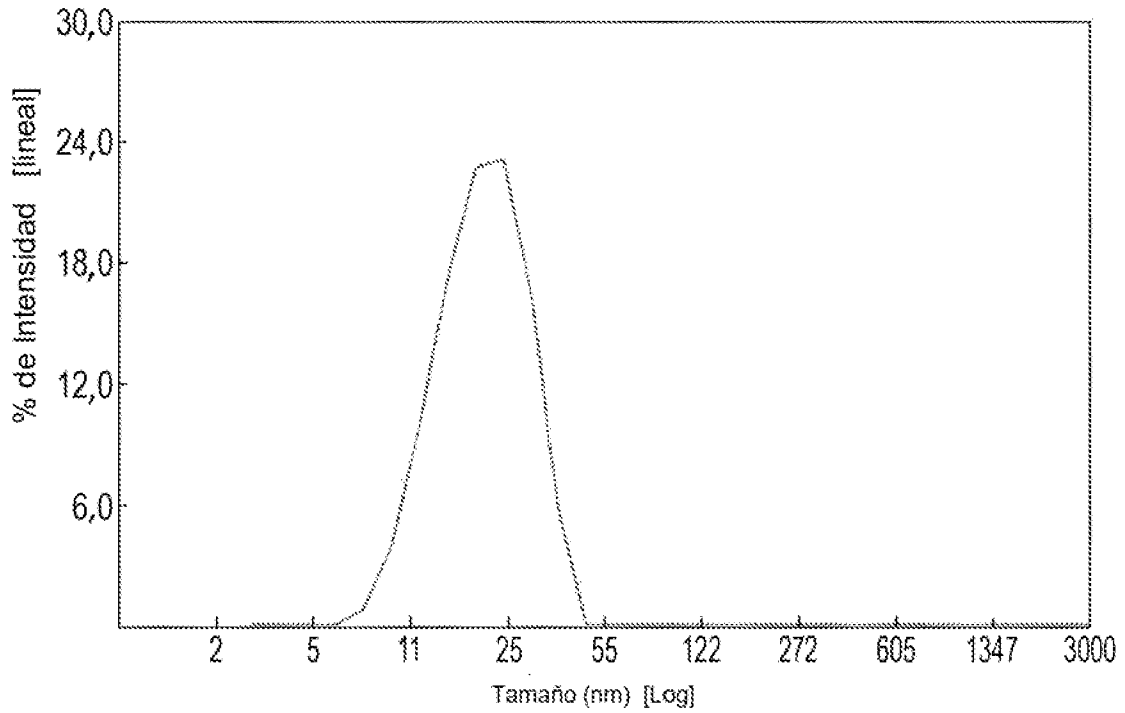


Figura 29D

Análisis de volumen SDP del conjunto SDP 1

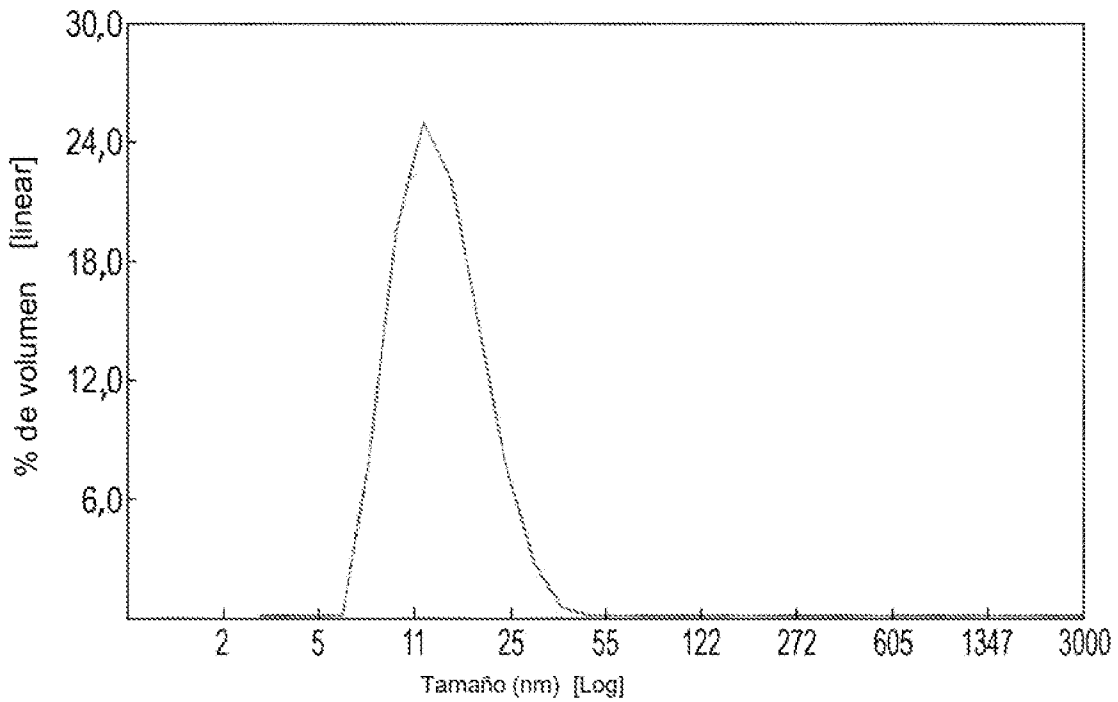


Figura 29E

Análisis del número SDP del conjunto SDP 1

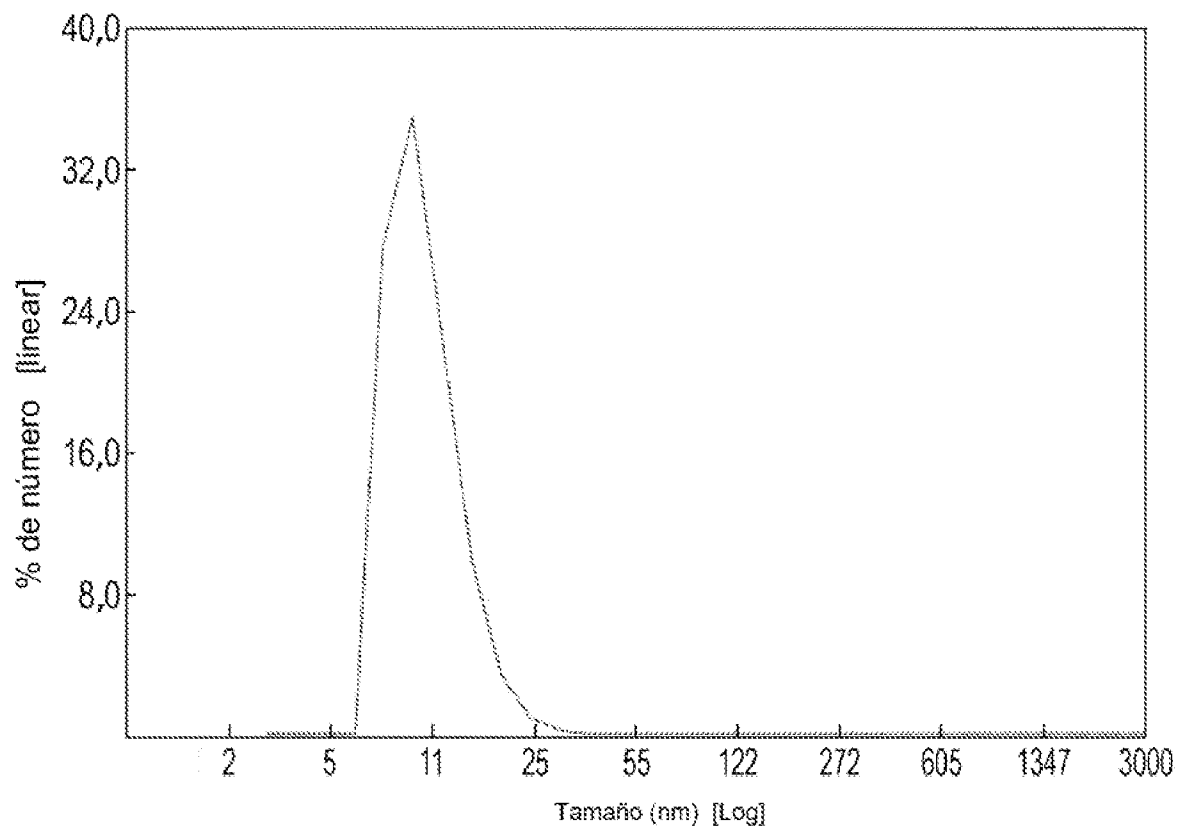


Figura 30A

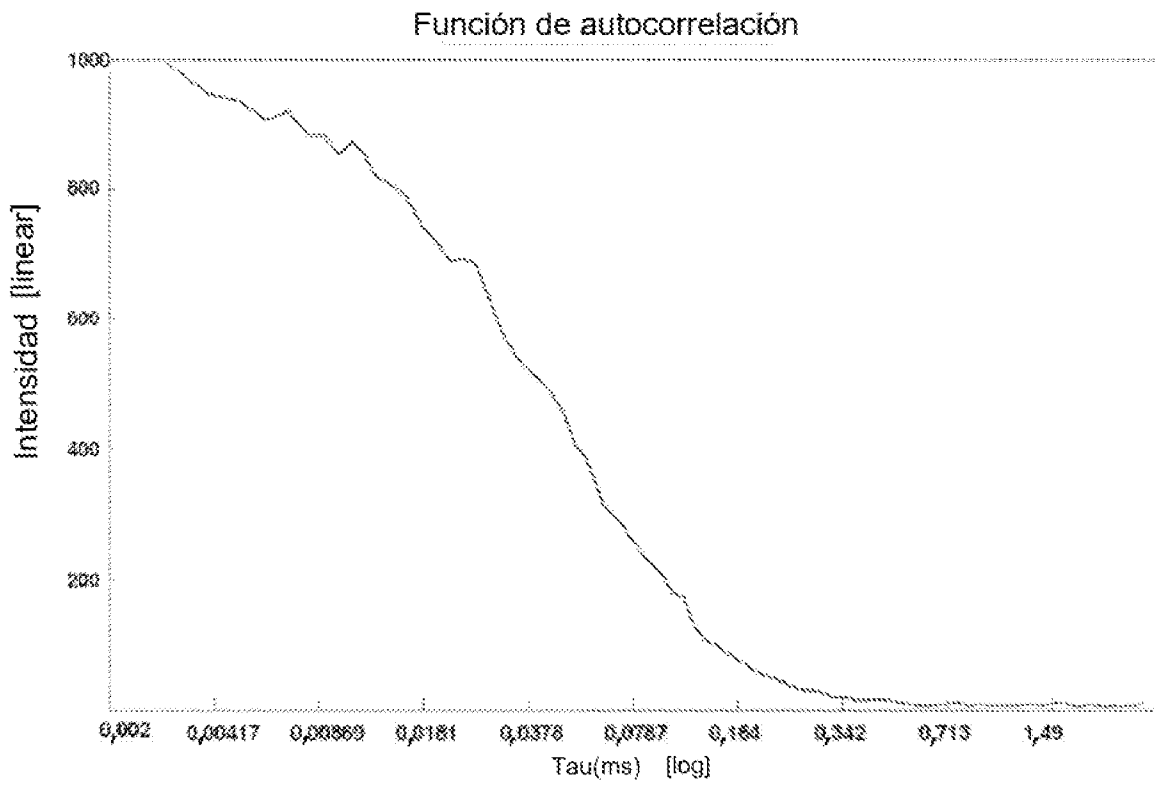


Figura 30B

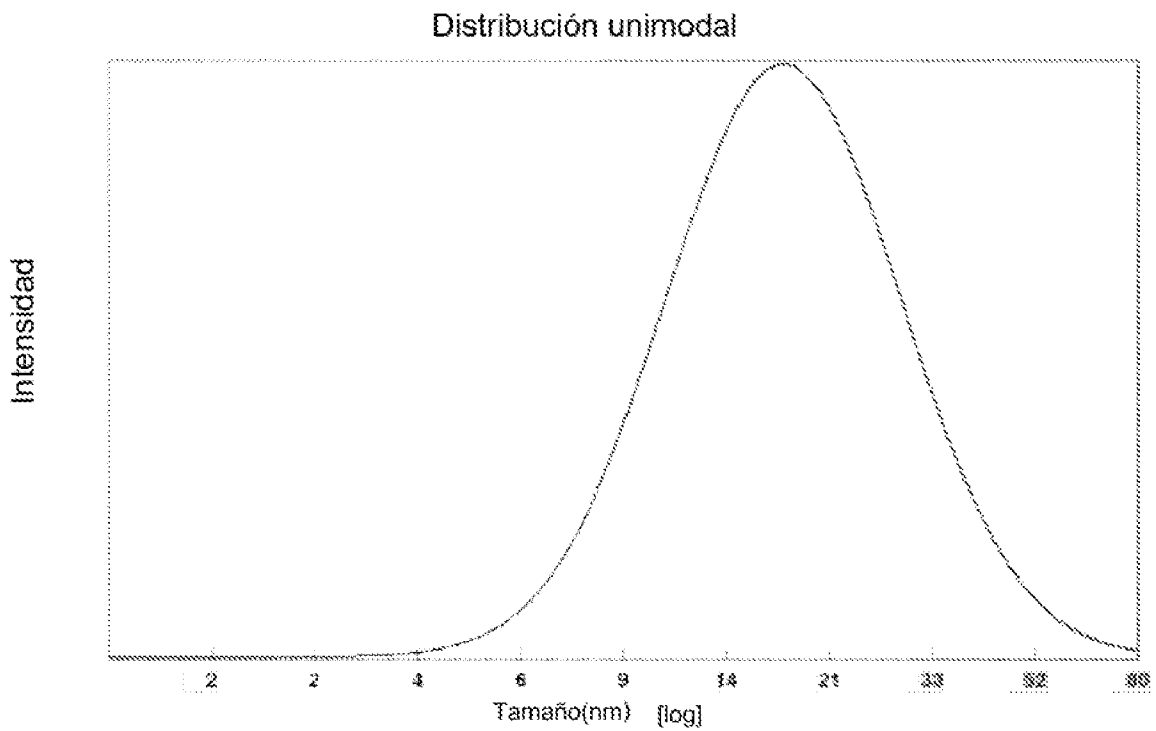


Figura 30C

Análisis de intensidad SDP del conjunto SDP 1

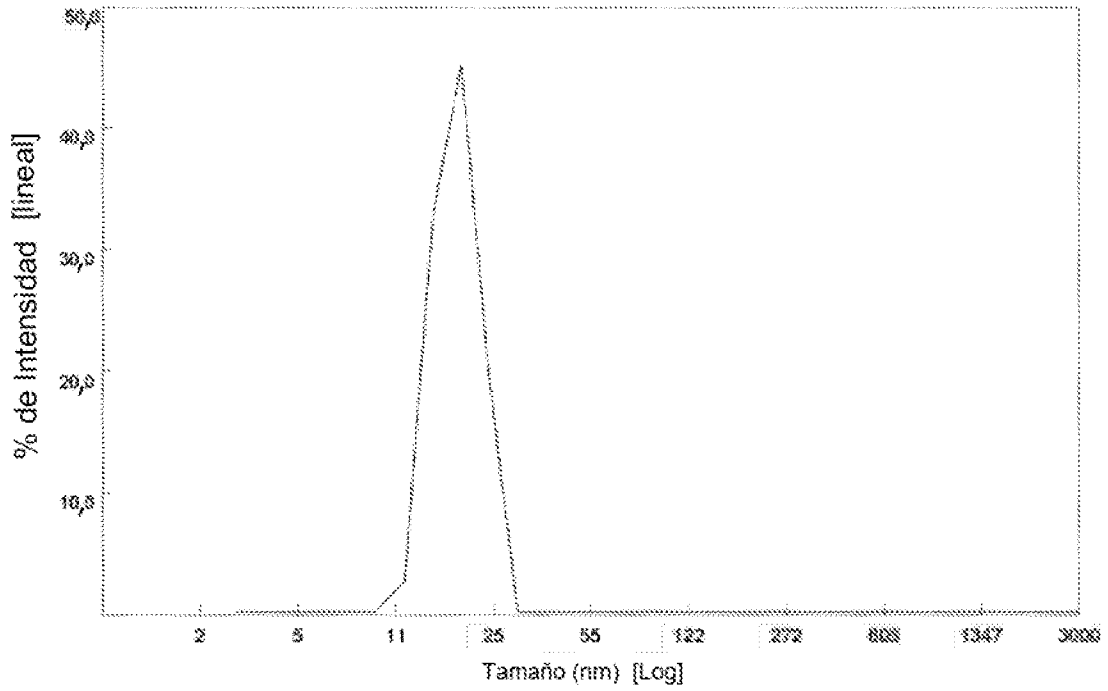


Figura 30D

Análisis de volumen SDP del conjunto SDP 1

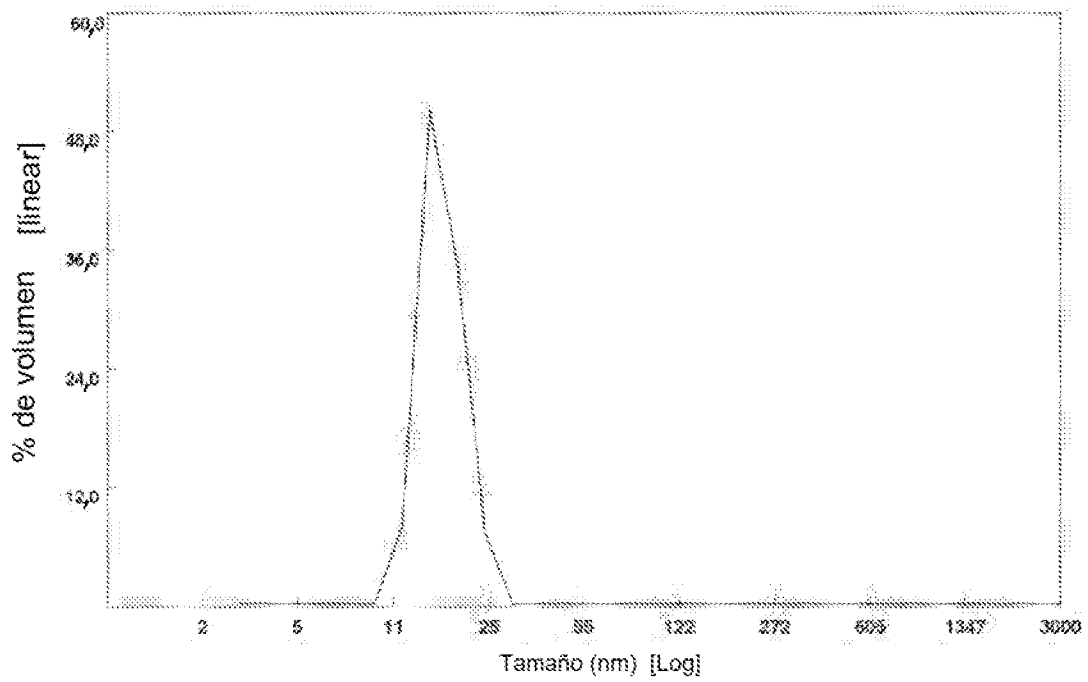


Figura 30E

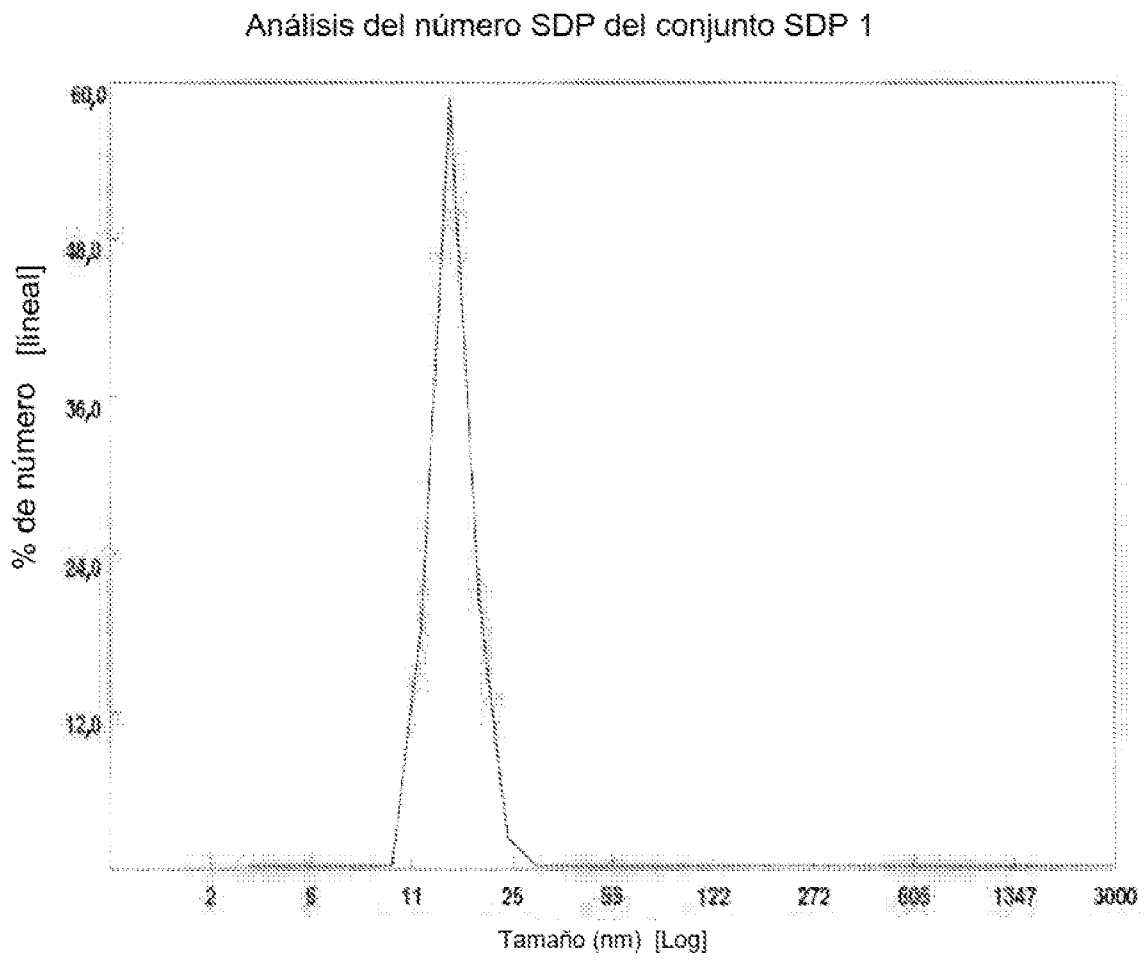


Figura 31A

Resultados de regularización: Nanocin 2%: Adq1

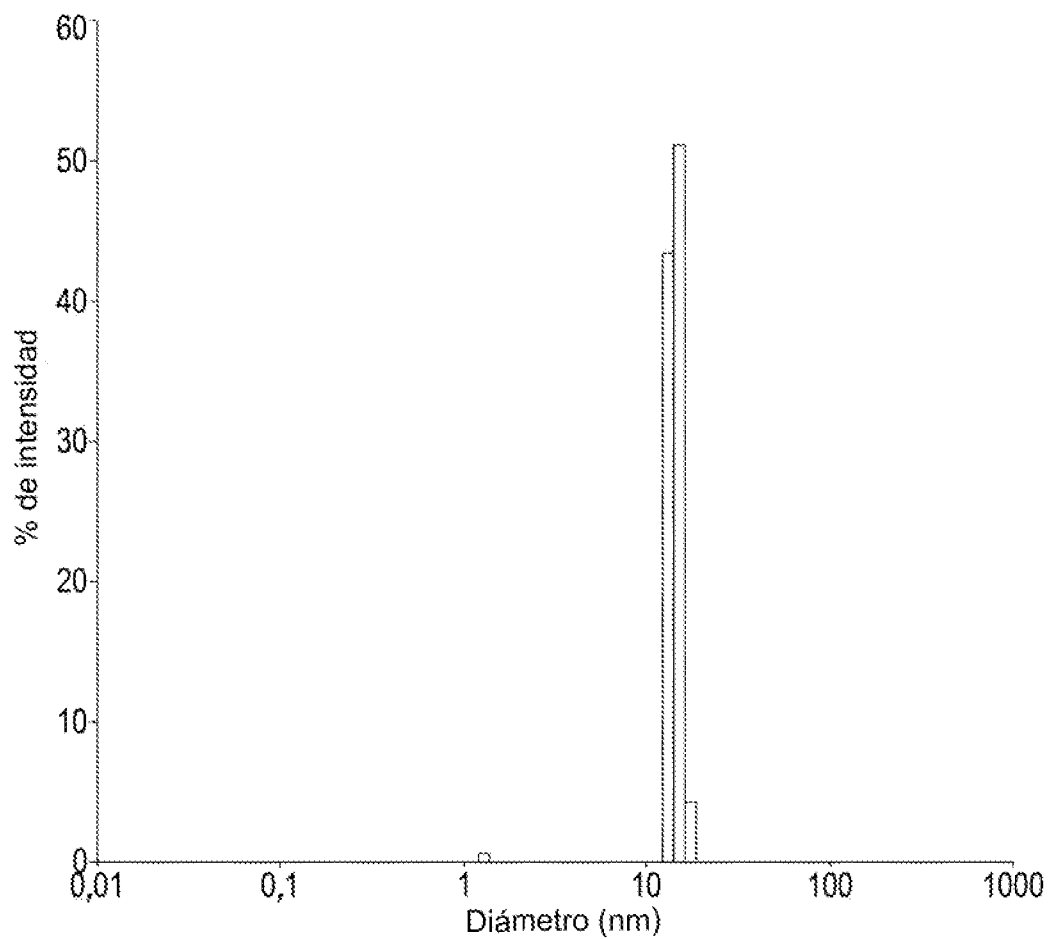


Figura 31B

Resultados de regularización: Nanocin 5%: Adq1

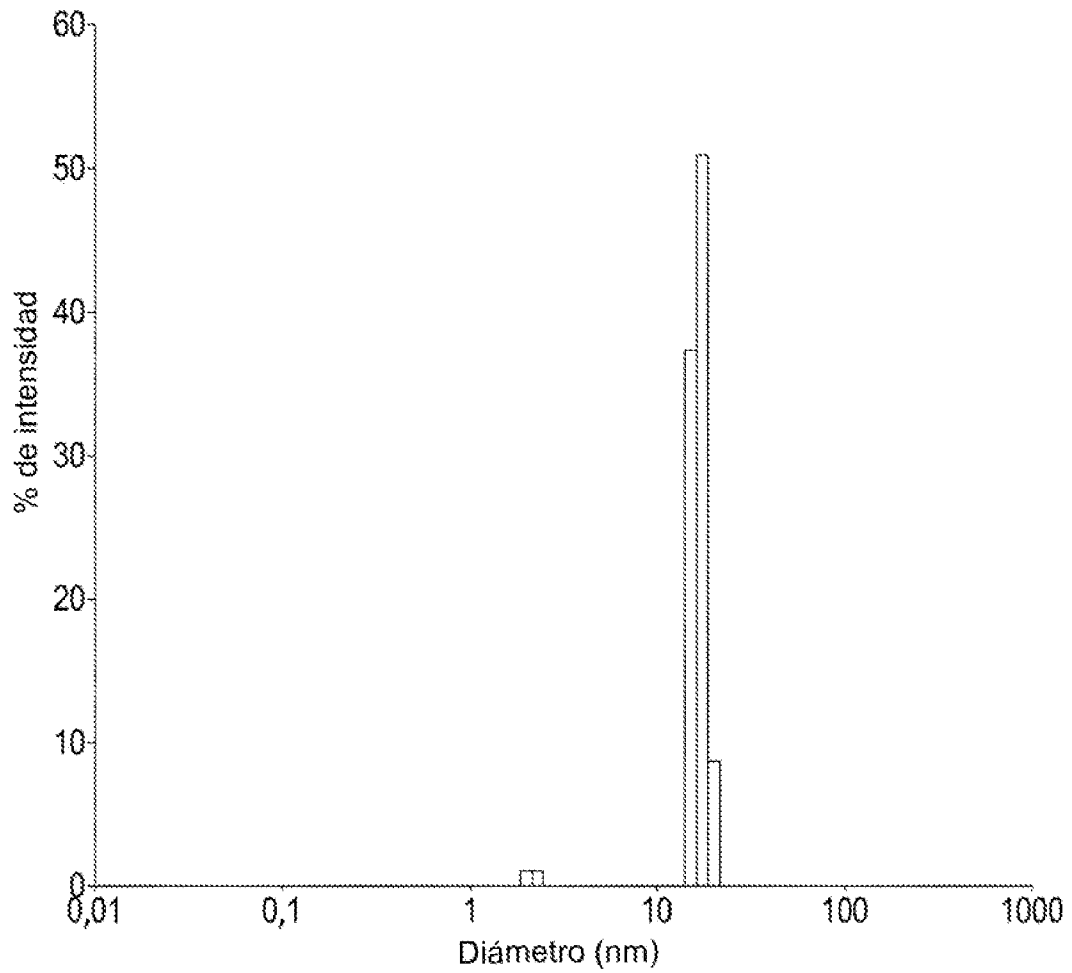


Figura 31C

Resultados de regularización: Nanocin 10%: Adq1

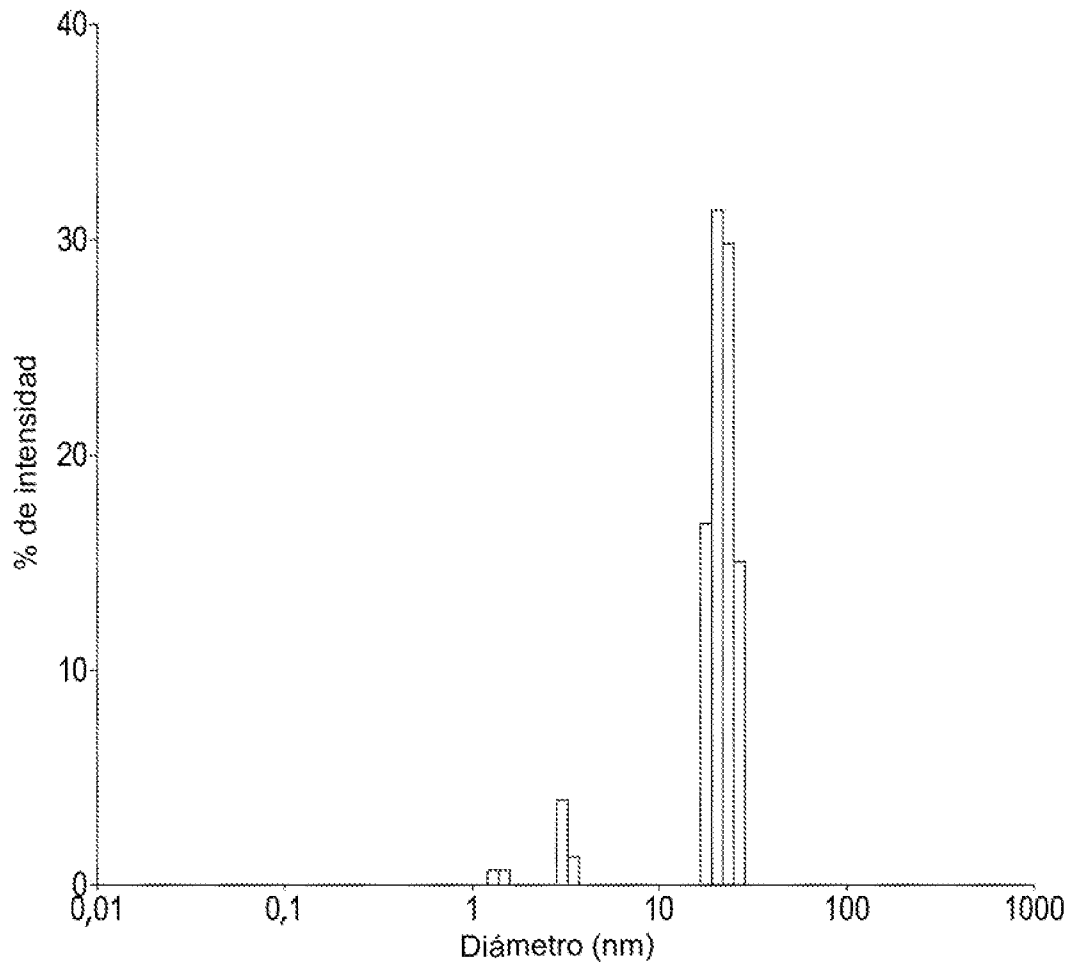


Figura 32A

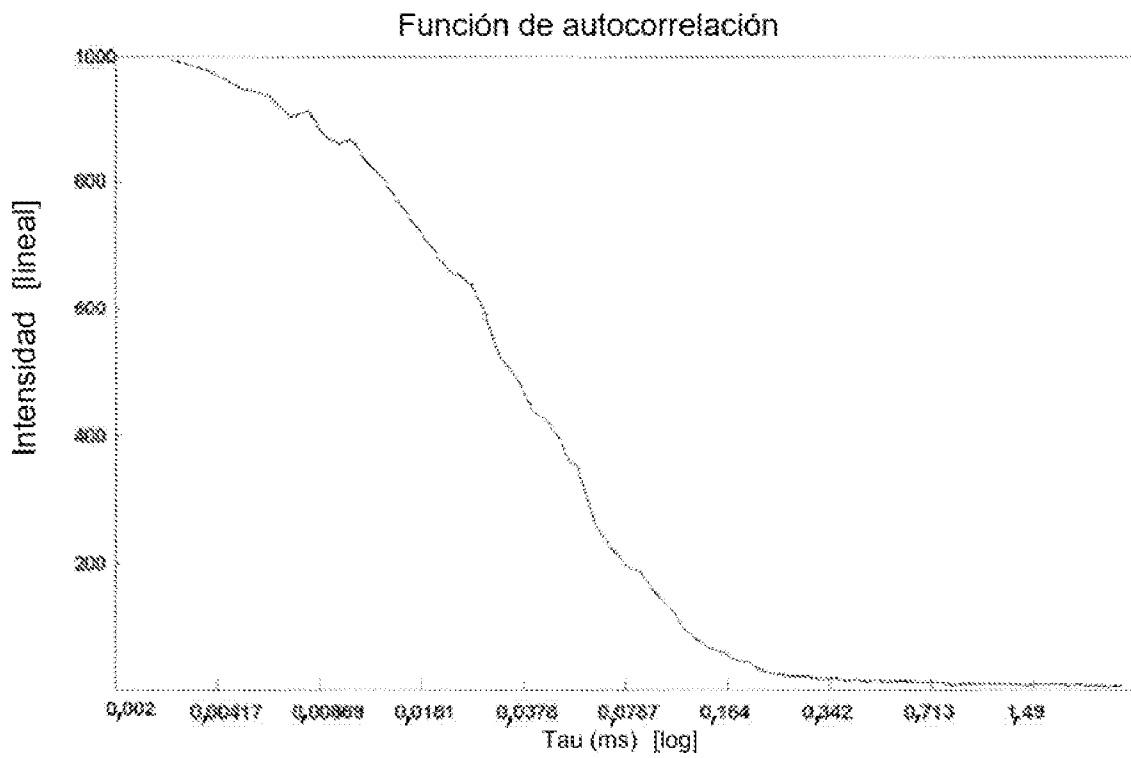


Figura 32B

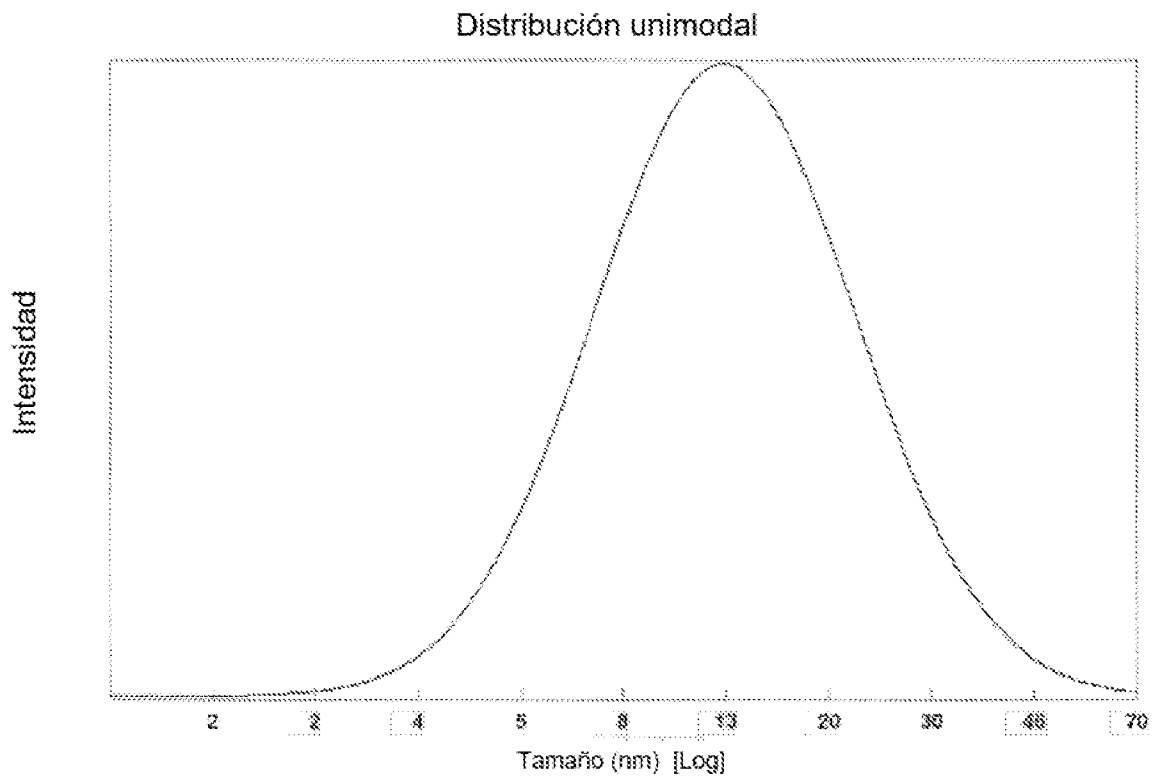


Figura 32C

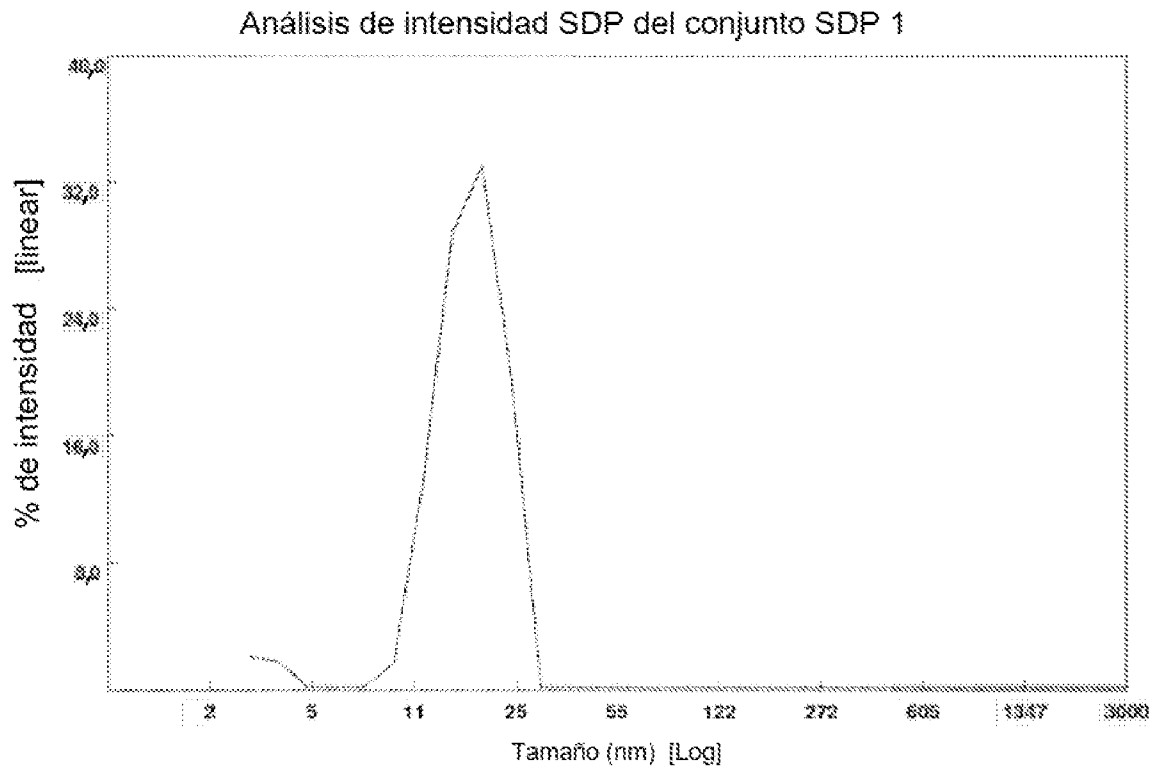


Figura 32D

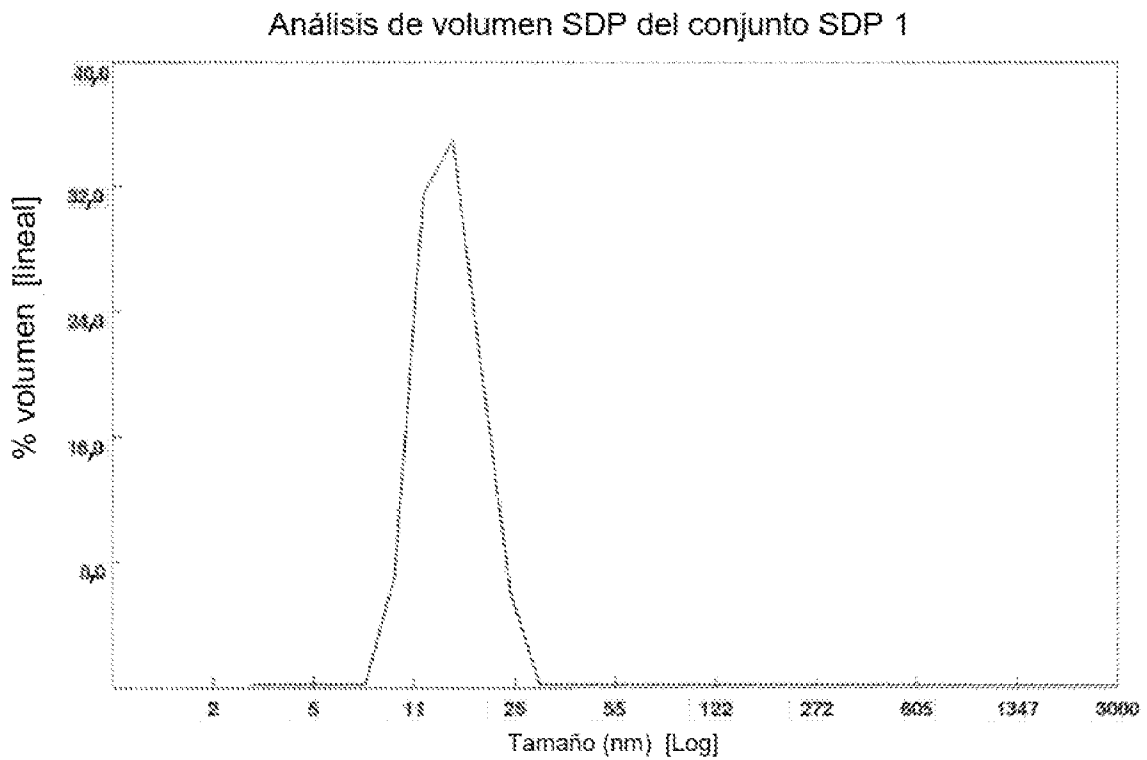


Figura 32E

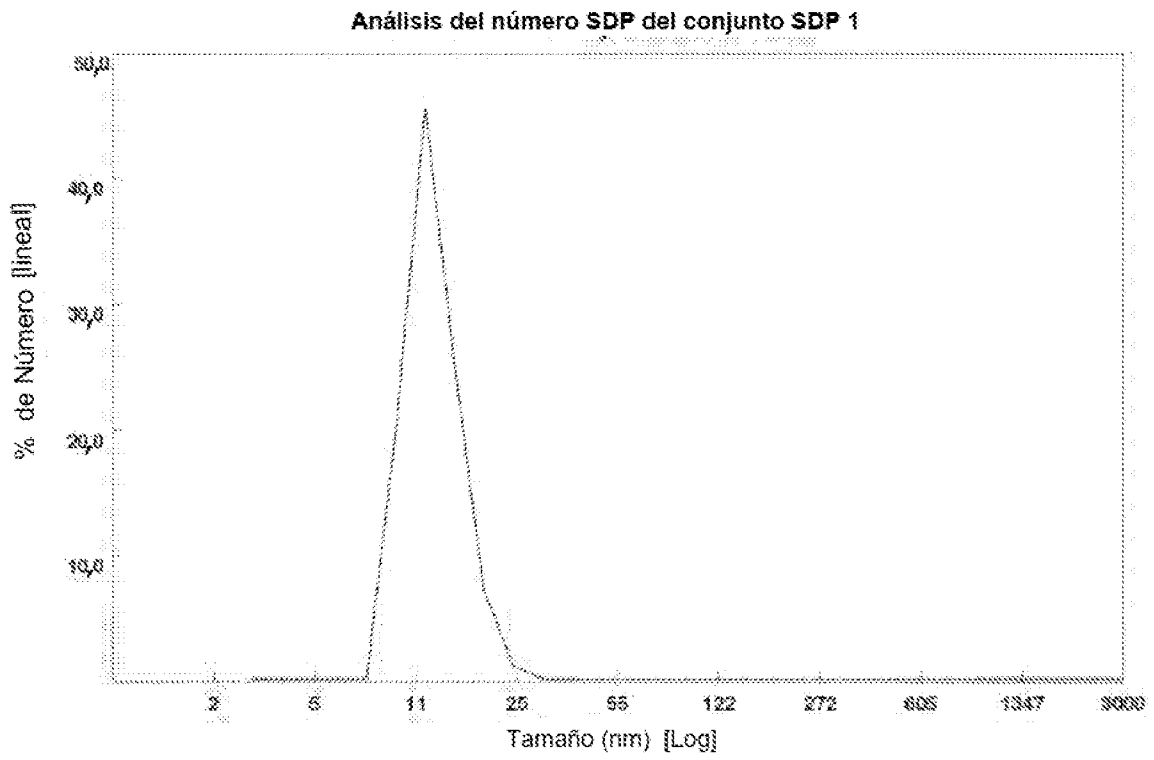


Figura 33A

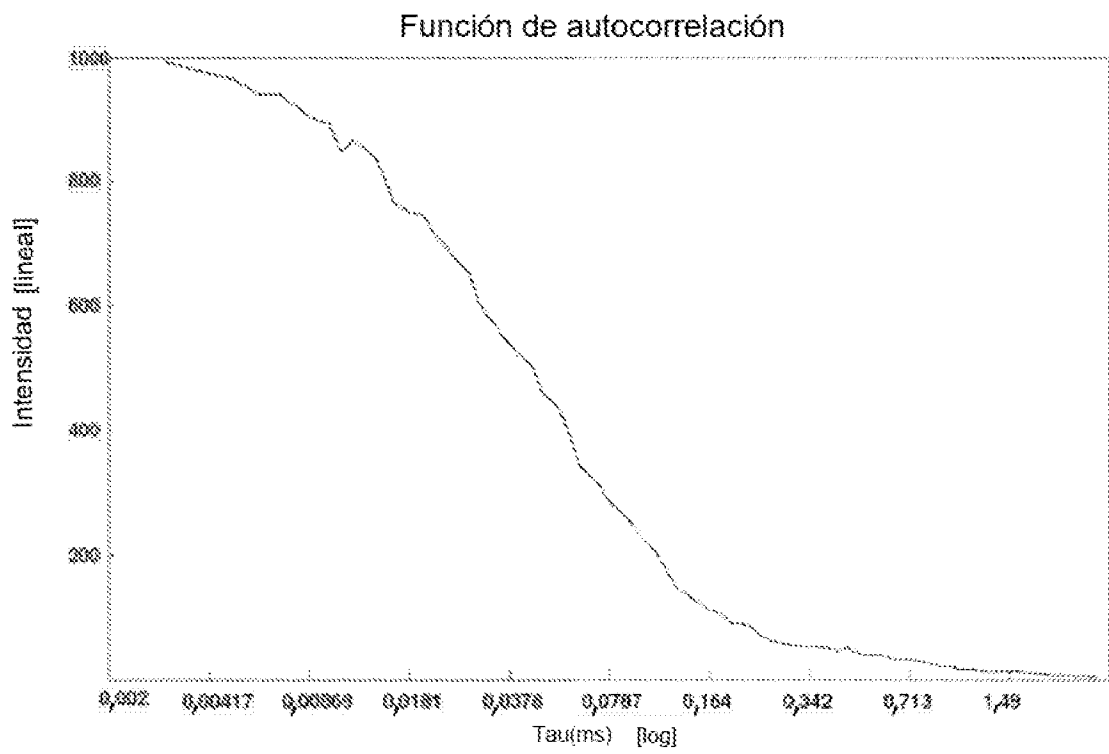


Figura 33B

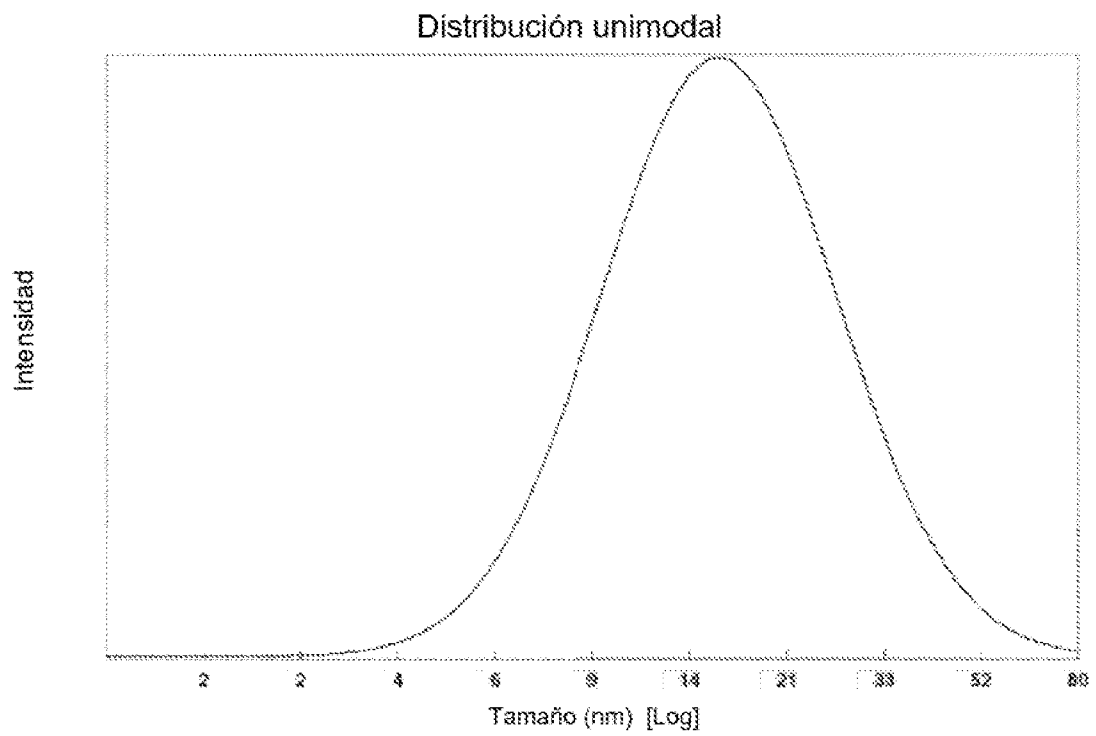


Figura 33C

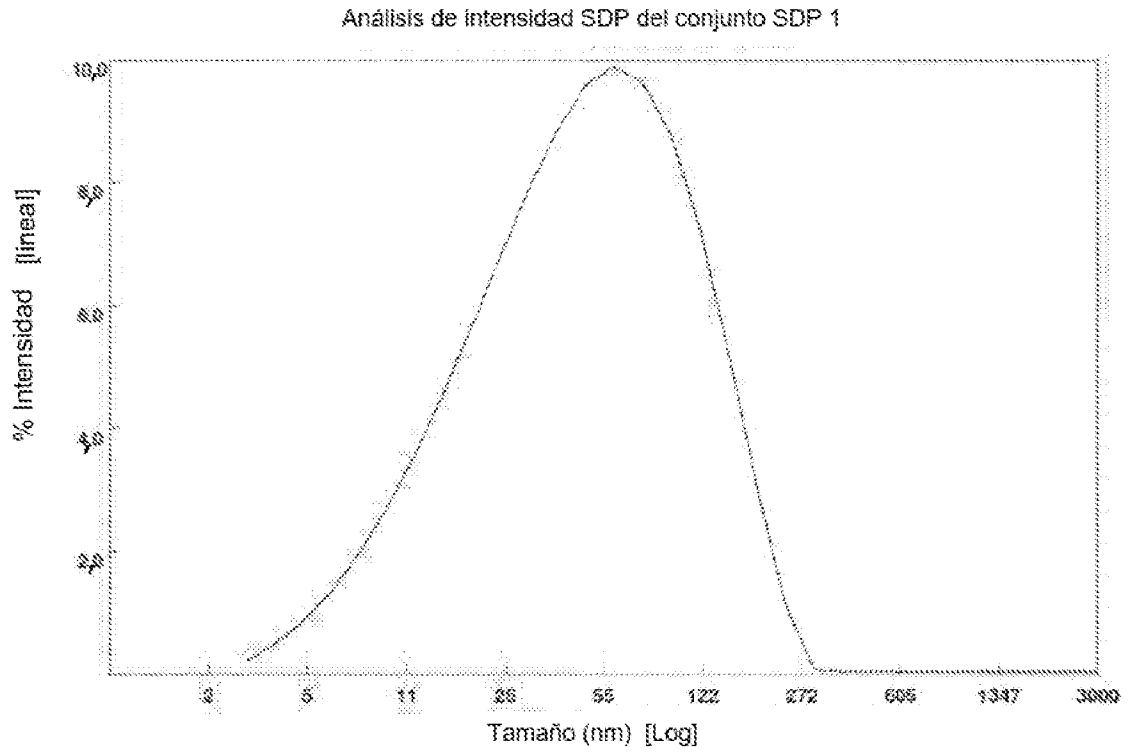


Figura 33D

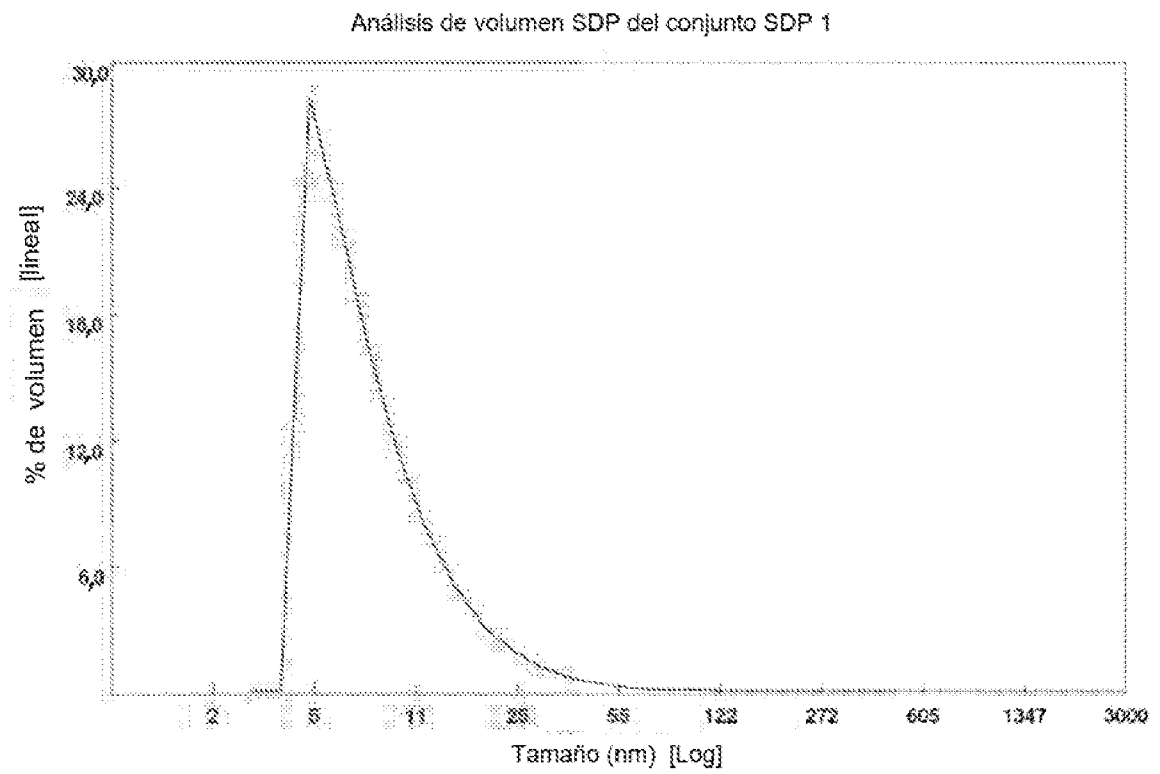


Figura 33E

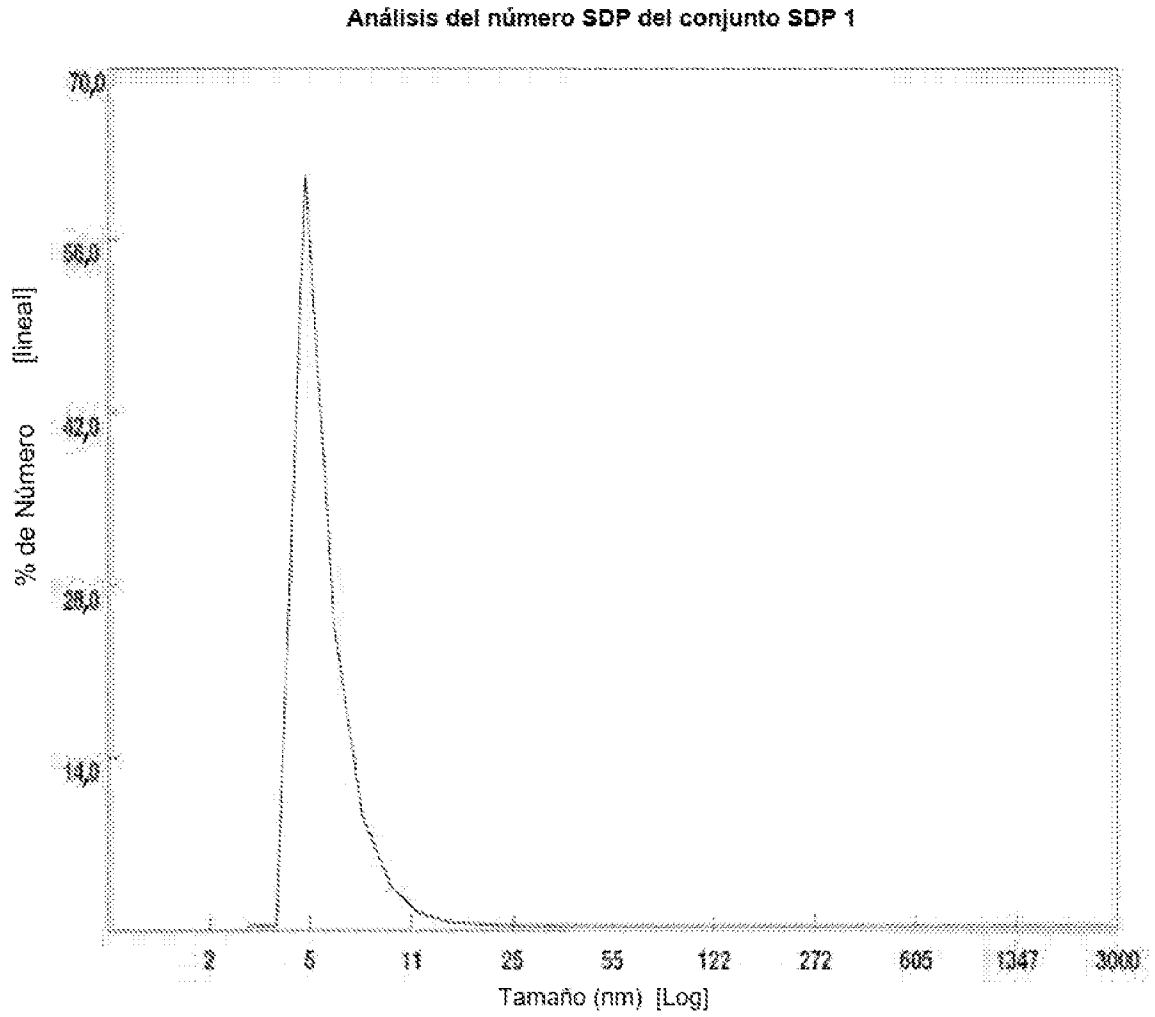


Figura 34A

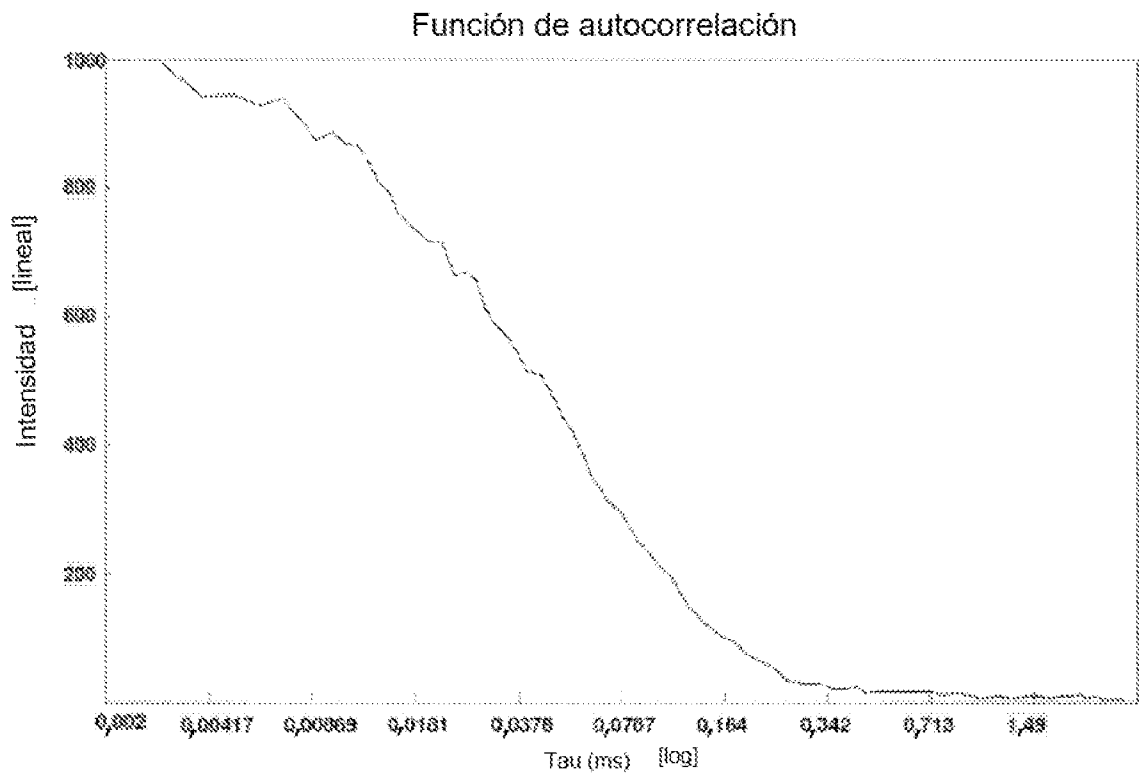


Figura 34B

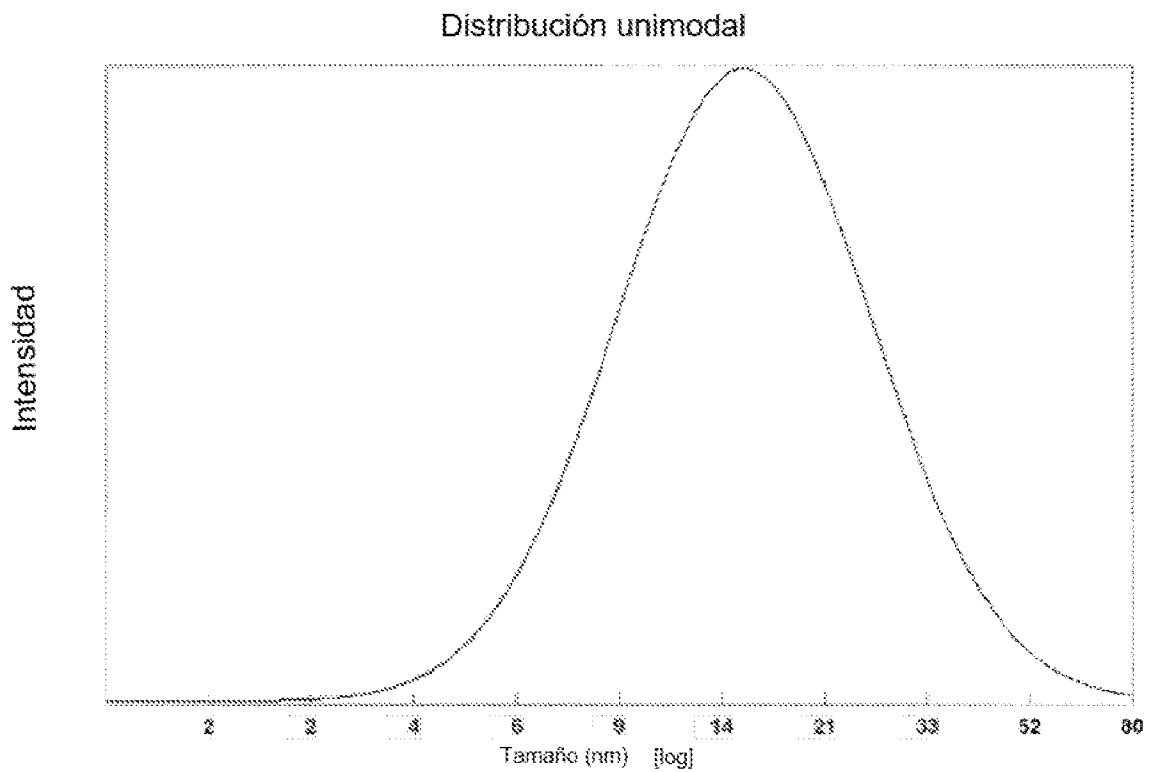


Figura 34C

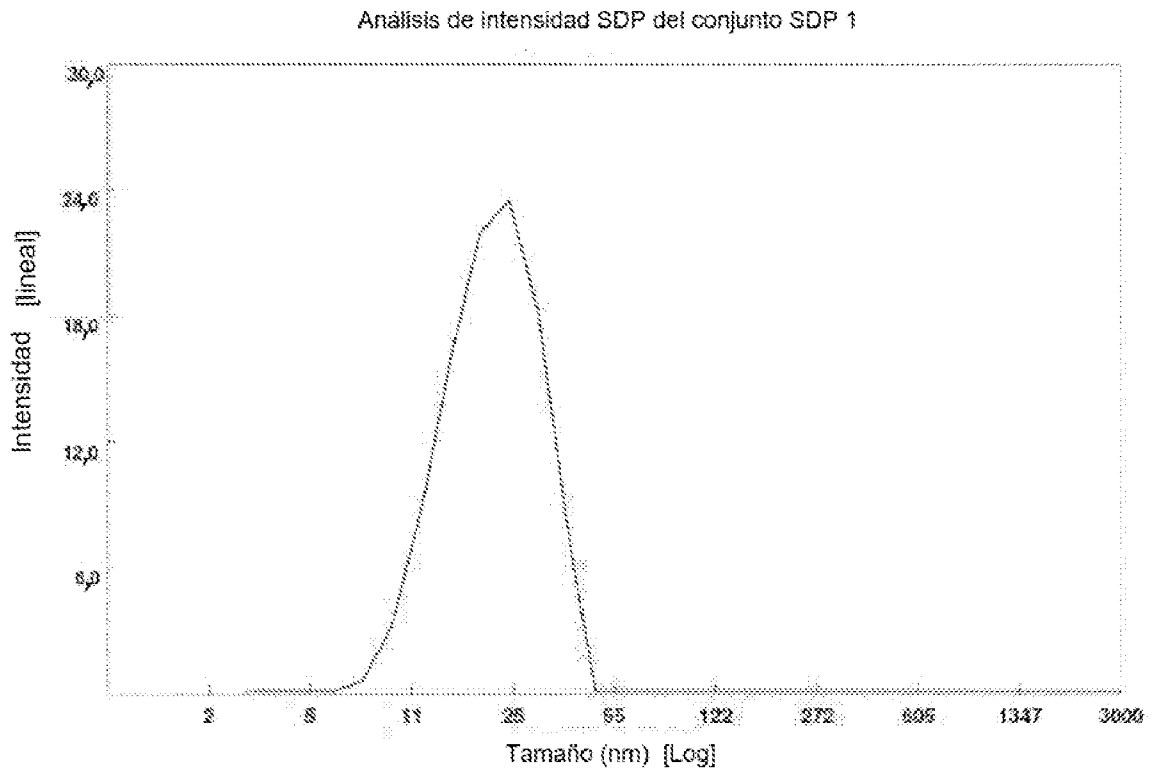


Figura 34D

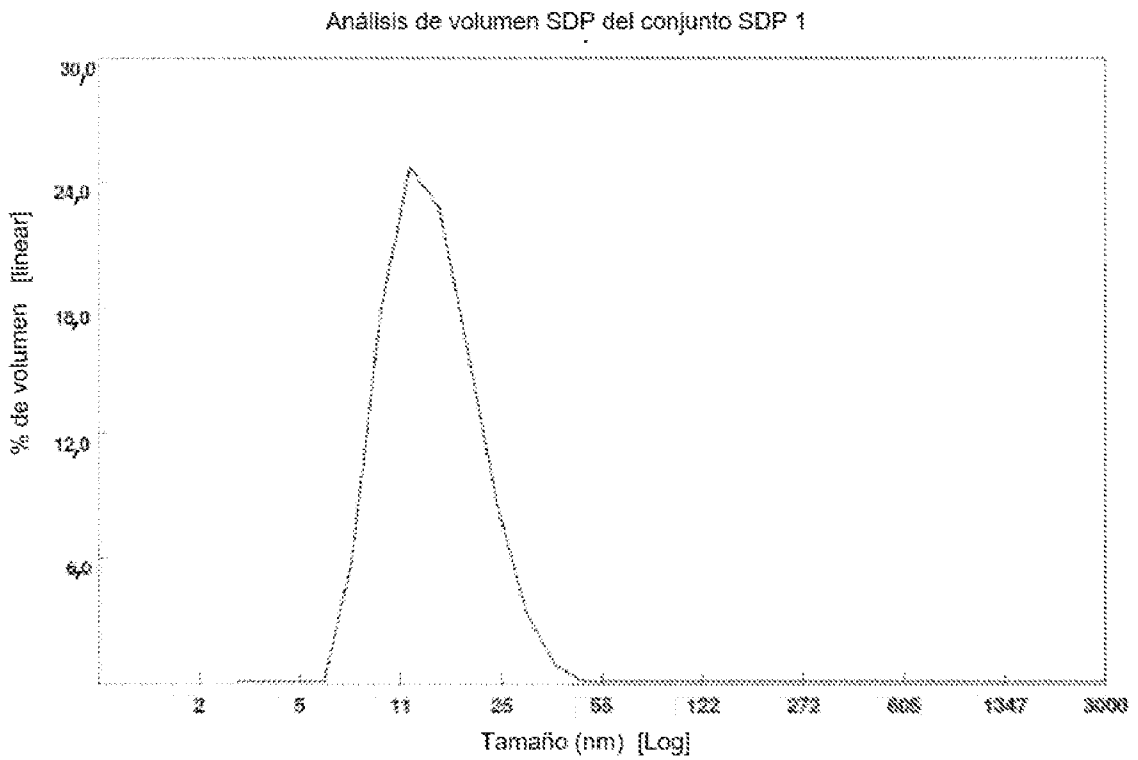


Figura 34E

