

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/107643 A1

(43) Fecha de publicación internacional
9 de septiembre de 2011 (09.09.2011)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 9/127 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070128

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de febrero de 2011 (28.02.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201030298 1 de marzo de 2010 (01.03.2010) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **DE LA MAZA RIVERA, Alfons** [ES/ES]; Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **LÓPEZ SERRANO, Olga** [ES/ES]; Jorge Girona Salgado, 18-26,

E-08034 Barcelona (ES). **RODRÍGUEZ DELGADO, Gelen** [ES/ES]; Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **RUBIO TOLEDANO, Laia** [ES/ES]; Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **BARBOSA, Lucyana** [BR/ES]; Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **SORIA RODRÍGUEZ, Guadalupe** [ES/ES]; Rosellón, 161 - 6ª y 7ª Planta, E-08036 Barcelona (ES). **PLANAS OBRADORS, Ana María** [ES/ES]; Rosellón, 161 - 6ª y 7ª Planta, E-08036 Barcelona (ES). **COCERA NÚÑEZ, Mercedes** [ES/ES]; Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: LIPOSOME-ENCAPSULATED BICELLES AND USE THEREOF IN DILUTED SYSTEMS

(54) Título : BICELAS ENCAPSULADAS EN LIPOSOMAS Y SU APLICACIÓN EN SISTEMAS DILUÍDOS

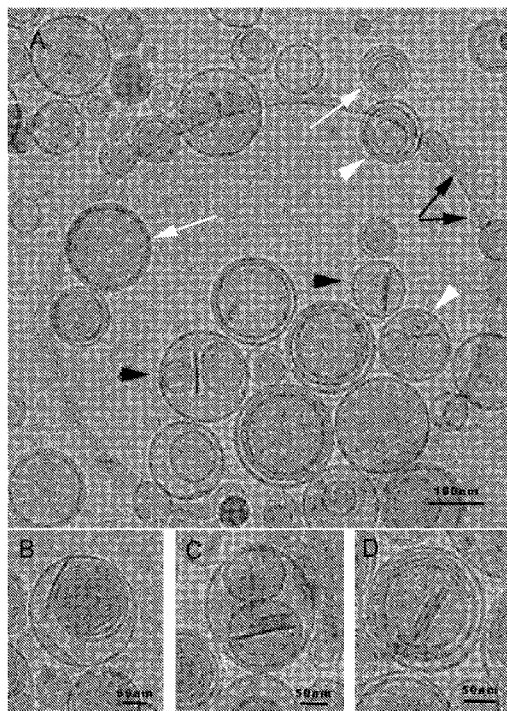


FIG. 4

(57) Abstract: The aim of the invention is to preserve the morphology of bicelles in high-water-content environments. For this purpose, the invention relates to a liposome comprising, in the internal aqueous solution thereof, at least one bicelle. The bicelle concentration in said solution is between 5 and 25 % dry weight in relation to the end liposome. The invention also relates to the use of the liposomes for the encapsulation of active principles, as well as to the use thereof as a drug or to produce a cosmetic product. The invention further relates to the method for obtaining said liposomes.

(57) Resumen: La presente invención tiene como finalidad preservar la morfología de las bicelas en ambientes con alto contenido en agua, por ello, la invención se refiere a un liposoma que comprende, en su solución acuosa interna, al menos, una bicela. La concentración de bicelas en dicha solución es de entre el 5 y 25% en peso seco con respecto al liposoma final. La invención también se refiere al uso de dichos liposomas para el encapsulado de principios activos, así como a su uso como medicamento o para la elaboración de un producto cosmético. Además, la presente invención se refiere al método de obtención de dichos liposomas.



WO 2011/107643 A1



RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

Bicelas encapsuladas en liposomas y su aplicación en sistemas diluídos.

5 La presente invención tiene como finalidad preservar la morfología de las bicelas en ambientes con alto contenido en agua, por ello, la invención se refiere a un liposoma que comprende, en su solución acuosa interna, al menos, una bicela. La concentración de bicelas en dicha solución es de entre el 5 y 25% en peso seco con respecto al liposoma final. La invención también se refiere al uso de dichos liposomas para el encapsulado de principios
10 activos, así como a su uso como medicamento o para la elaboración de un producto cosmético. Además, la presente invención se refiere al método de obtención de dichos liposomas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Los liposomas han sido objeto de numerosos estudios debido a su potencial uso para micro-encapsular medicamentos y sus aplicaciones en cosmética y clínica (Teschke, O.; de Souza, E. F. *Langmuir* 2002, 18, 6513).

20 Un liposoma es una vesícula esférica y hueca compuesta principalmente por fosfolípidos que constan de una cabeza hidrosoluble y de una cola liposoluble, organizados en bicapas. Las colas lipofílicas de los fosfolípidos entran en contacto entre ellas formando una membrana de doble capa que es hidrófila en sus partes exteriores y lipófila en su interior, esta membrana encierra un
25 interior acuoso.

Actualmente, se utilizan como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula debido a que son los transportadores más eficaces para introducir sustancias en las células, con un amplio campo de
30 aplicación. Algunas de estas sustancias son medicamentos o cosméticos, e incluso se utilizan en biotecnología, en algunos casos de terapia genética, para introducir genes de un organismo en otro diferente.

35 El uso de estas estructuras como transportadores tiene la ventaja de que se pueden programar para que el medicamento pueda liberarse durante largo

tiempo. Además, poseen una tendencia natural a ligarse a células y tejidos, logrando la máxima eficacia terapéutica y minimizando los efectos secundarios no deseados, así, los liposomas conjugados con anticuerpos se unen a células diana con más facilidad que las formas solubles de los anticuerpos. Desde el punto de vista químico, son similares a células que circulan en la sangre con las que son compatibles y, por otra parte, son un método útil de protección de productos lábiles debido a que no sufren degradación y actúan eficazmente.

Otras aplicaciones que se atribuyen a estas estructuras son: dirigir inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario, liberación controlada de medicamentos frente a infecciones de tipo sistémico, reducir los efectos secundarios de algunos medicamentos, en métodos de diagnóstico o como sustitutivos de células en sangre.

Pero el uso de liposomas como transportadores no estaría limitado sólo al campo sanitario, en la industria textil la microencapsulación es una tecnología novedosa que permite sustituir las dispersiones o emulsiones de determinadas sustancias por fluidos similares en donde dichos compuestos se encuentran dispersos en el interior de microcápsulas de sustancias inertes, que se fijan al textil por un sistema efectivo. Las propiedades finales conferidas al textil, provienen del tipo de encapsulado realizado y del mecanismo de liberación conseguido. Hasta ahora a nivel industrial, la producción de tejidos biofuncionales (tejidos inteligentes) ha seguido una vía de desarrollo empírica basada en el sistema "ensayo-error". Sin embargo, este proceso requiere de un conocimiento físico-químico eficaz de las interacciones existentes a nivel fibra-microcápsula. En caso contrario, no es posible optimizar ni la tecnología de aplicación ni controlar la liberación del principio activo. En este sentido, los liposomas se están utilizando como microencapsulantes en procesos industriales de tintura de la lana (Martí, M. et al. *Textile Res. J.* 2001, 71(8), 678-682; Martí, M. et al. *Inter. Textile Bull.* 2003, 2, 60-64; Martí, M. et al. *Text. Res. J.* 2004, 74(11), 961-966).

Estas estructuras con diámetros comprendidos entre 100nm. a 1µm. poseen el inconveniente de que son demasiado grandes para pasar a través de la piel

en aplicaciones transdérmicas.

Por otro lado, las bicelas son nano-estructuras discoidales compuestas por un fosfolípido de cadena larga situado en el centro de una zona bilaminar plana y un fosfolípido de cadena corta situada en los bordes (Sanders, C. R.; Hare, B. J.; Howard, K. P.; Prestegard, J. H. *Prog. NMR Spectroscopy* 1994, 26, 421). La característica de estos sistemas, constituidos sólo por lípidos, de organizarse en bicapas y su propiedad de alinearse en un campo magnético, ha permitido su amplia utilización como modelos de membranas en diversos estudios estructurales de membranas de proteínas y péptidos (Sanders, C. R.; Prestegard, J. H. *Biophys J.* 1990, 58, 447).

Recientemente se ha propuesto el uso de bicelas en aplicaciones dermatológicas debido a su pequeño tamaño, suficiente para pasar a través de la piel. Estos estudios han demostrado que la acción de las bicelas sobre la barrera de la piel depende de diferentes variables de composición actuando como agentes permeabilizantes de la piel o como agentes de refuerzo de sus estructuras lipídicas (Barbosa-Barros, L.; Barba, C.; Cócera, M.; Coderch, L.; López-Iglesias, C.; de la Maza, A.; López, O. *Inter. J. Pharmaceut* 2008, 352, 263). Además de la utilización de bicelas para la mejora de la piel se está estudiando la posibilidad de que las bicelas incorporen medicamentos y otros compuestos bioactivos.

El problema que se presenta cuando se trabaja con bicelas es que adquieren diferentes morfologías dependiendo de la razón molar entre el fosfolípido de cadena larga y el de cadena corta, de la concentración total de fosfolípidos y de la temperatura. Así, por ejemplo, en condiciones de alta dilución las pequeñas bicelas discoidales se convierten en estructuras grandes, tales como vesículas, láminas, micelas en forma de varilla, etc. Este comportamiento podría dificultar la aplicación de estos sistemas por vía sistémica debido a que las propiedades de las bicelas se verían afectadas por la dilución, y el daño que estas estructuras podrían comportar no está bien definido.

Un método para estabilizar la estructura de las bicelas en condiciones de alta dilución sería desarrollarlas a partir de mezclas de lípidos conjugados con polietilenglicol (PEG-lípidos). El problema de este método es que las bicelas obtenidas pierden algunas de sus propiedades, como por ejemplo, la capacidad de potenciar la permeabilidad.

Por tanto, persiste el problema de estabilizar la estructura de las bicelas en ambientes diluidos.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Con el fin de mantener el tamaño y la forma de las pequeñas bicelas discoidales, la presente invención proporciona un método para encapsularlas en vesículas lipídicas o liposomas.

En condiciones de alta dilución, las nanoestructuras bicelares pierden su morfología convirtiéndose en vesículas esféricas con tamaños muy superiores, comportamiento que podría dificultar el uso de estos compuestos a través de la ruta sistémica donde el contenido de agua es muy alto.

Sin embargo, en ambientes diluidos, los liposomas son morfológicamente estables, lo que les hace buenos transportadores para aplicaciones sistémicas, presentándose como un método útil para estabilizar la morfología de las bicelas.

Por tanto, la presente invención se refiere a unas nuevas estructuras lipídicas que combinan las propiedades de sus elementos constituyentes: los liposomas y las bicelas. Se trata de sistemas lipídicos formados por una membrana fosfolipídica exterior que forma una vesícula y que contiene en su interior estructuras discoidales también lipídicas.

En este sentido, un aspecto de la presente invención se refiere a un liposoma que comprende en su solución acuosa interna al menos una bicela.

En una realización preferida de la presente invención, el liposoma comprende una concentración de bicelas de entre el 5 y el 25% en peso seco respecto al liposoma final. La concentración de bicelas se expresa como tanto por ciento en peso seco con respecto al peso seco del liposoma final, es decir, del liposoma que comprende dicha bicela.

El liposoma estaría formado por una vesícula exterior (estructuralmente muy resistente frente a cambios del medio) que tiene como función aislar y proteger a las bicelas que contiene en su interior (estructuras discoidales, muy versátiles y modulables), permitiendo de esta manera mantener su forma y tamaño para que puedan ser usadas en aplicaciones que conlleven su administración a través de distintas vías donde el contenido en agua es muy alto, como por ejemplo, pero sin limitarse a, vía digestiva, vía parenteral, vía respiratoria y vía tópica.

Las bicelas son estructuras muy sensibles a los cambios del medio donde se encuentran, por lo que el aislamiento de estas estructuras las protege de posibles variaciones. Este aislamiento se lleva a cabo mediante la encapsulación de dichas bicelas en el interior de vesículas lipídicas o liposomas, donde la membrana lipídica exterior del liposoma asegura el aislamiento y estabilidad de la bicela capturada en su interior. Es decir, dentro de la vesícula lipídica se crea el microambiente perfecto para que la bicela pueda conservar su morfología en todo momento. Además, los liposomas ofrecen la ventaja de ser estables con la temperatura y la dilución a diferencia de las bicelas sin encapsular.

Una de las propiedades más interesantes que poseen las bicelas es la capacidad de potenciar la permeabilidad para poder atravesar las distintas barreras fisiológicas como son la barrera hematoencefálica, la barrera del estrato córneo de la piel, diferentes membranas mucosas como por ejemplo, pero sin limitarse a, la oral, gástrica, intestinal, nasal, conjuntival, pulmonar, y otras barreras fisiológicas.

Este efecto permeabilizador que presentan es debido a su pequeño tamaño y a su composición (fosfolípidos de cadena larga y fosfolípidos de cadena corta

con efecto activador de superficie o tensioactivo) y se origina porque los lípidos de las bicelas se mezclan con los lípidos de las membranas de los tejidos modificando su fluidez y permeabilidad.

5 La capacidad de potenciar la permeabilidad de diferentes barreras biológicas (como son la barrera hematoencefálica, la barrera del estrato córneo de la piel, diferentes membranas mucosas como por ejemplo, pero sin limitarse a, la oral, gástrica, intestinal, nasal, conjuntival, pulmonar, y otras barreras fisiológicas) y, por tanto, el paso a través de estas barreras proporciona a las
10 bicelas una gran ventaja para su aplicación en el campo de la medicina y la farmacia.

La temperatura junto con la hidratación son parámetros clave en la estructura que va a adoptar una bicela y, por tanto, muy importantes para que tenga
15 lugar la correcta formación del liposoma descrito en el aspecto anterior.

Cuando se modifica la concentración total de lípidos se inducen cambios morfológicos en la estructura de la bicela causados por la variación en el contenido de agua. Cuando la cantidad de agua se incrementa, la
20 concentración de fosfolípido en agua decrece por lo que es eliminado de la estructura de las bicelas (principalmente de los extremos) para liberarse en el agua en forma de monómeros. Este hecho y la alta hidrofobicidad de las moléculas de fosfolípido de cadena larga que componen la bicela inducen un incremento en la razón molar (q) entre el fosfolípido de cadena larga y el de
25 cadena corta y, como consecuencia, un aumento en el diámetro de las bicelas.

A una concentración del 20% en contenido lipídico, las bicelas son estructuras discoidales pequeñas (menores de 10 nm) mientras que al aumentar el agua
30 en el sistema las estructuras pequeñas se van transformando en agregados de mayor tamaño de forma que a concentraciones del 0,62% en lípido ya se empiezan a detectar estructuras con tamaños de 500 nm mezcladas con agregados más pequeños y a concentraciones lipídicas del 0,15% sólo se detectan estructuras muy grandes mayores de 500nm, por lo que
35 preferiblemente, la bicela se encuentra a una concentración del 20% en

contenido lipídico total.

Según otra realización preferida, la temperatura de transición media de los lípidos del liposoma descrito en el aspecto anterior es de entre 4 y 40 °C.

5

En la presente invención el término “temperatura de transición de fase”, T_m , hace referencia a la temperatura en la que el sistema pasa de la fase gel a la fase cristal líquido. Se tendrán que tener en cuenta dos T_m distintas, la T_m de los lípidos que forman el liposoma y la T_m de los lípidos que forman la bicela. Aunque las bicelas están formadas por una mezcla de dos tipos de lípidos, se considerará como la temperatura de transición de fase de las bicelas aquella correspondiente con el fosfolípido de cadena larga, ya que éste es el responsable de que se forme la bicapa de la estructura y la transición de fase a la que nos referimos está obligatoriamente ligada a la formación de bicapas.

10

El término “temperatura de transición media” hace referencia al intervalo de temperaturas en el que la T_m de la bicela y la T_m del liposoma coinciden, y por tanto, el intervalo de temperaturas en el que el liposoma descrito en el aspecto anterior se mantiene estable.

15

Teniendo en cuenta que la T_m de los lípidos del liposoma es de entre -20 y 40°C y que la T_m de los lípidos de la bicela es de entre 4 y 60°C, la temperatura de transición media del liposoma descrito en el aspecto anterior está en el intervalo comprendido entre 4 y 40°C.

20

En otra realización preferida, la bicela contenida en el liposoma comprende fosfolípidos de cadena larga en su región central plana y fosfolípidos de cadena corta en las regiones de los extremos.

25

Cada fosfolípido contenido en la bicela está formado por glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. Como hemos dicho, según donde se sitúe el fosfolípidos en la bicela encontraremos que la cadena de ácidos grasos será mayor o menor. Así, los fosfolípidos situados en la región central plana deben poseer una cadena de ácido graso de como mínimo 12 carbonos, preferiblemente de como mínimo 15 carbonos, y más preferiblemente aún de – como mínimo 18 carbonos; mientras que la cadena

30

35

de ácido graso de los fosfolípidos situados en los extremos tendrá una longitud de, como máximo, 8 átomos de carbono, preferiblemente de - cómo máximo - 7 carbonos, y más preferiblemente aún de - cómo máximo - 5 carbonos.

5 En la figura 1 puede observarse cómo se van situando los fosfolípidos en la bicela según la longitud de su cadena hidrocarbonada.

En una realización más preferida, la razón de las concentraciones molares de los fosfolípidos de cadena larga y de cadena corta de la bicela es de entre 1 y 10, preferiblemente entre 1,5 y 9, y más preferiblemente entre 2 y 8. En otra realización más preferida, la diferencia entre el número de carbonos entre los fosfolípidos de cadena larga y cadena corta de la bicela es de entre 5 y 25, preferiblemente entre 7 y 22, y más preferiblemente entre 8 y 20.

15 Como se ha mencionado anteriormente, una diferencia significativa entre el número de carbonos de los distintos fosfolípidos que componen la bicela proporciona a esta estructura la capacidad de incrementar la permeabilidad para atravesar distintas barreras fisiológicas como podrían ser la barrera del estrato córneo de la piel o la barrera hematoencefálica.

20 Debido a que la composición de la bicapa fosfolipídica condiciona muchos parámetros a tener en cuenta como la densidad de empaquetamiento, flexibilidad, resistencia osmótica, estabilidad "in vivo" e "in vitro", permeabilidad, carga eléctrica, capacidad antigénica, etc., los fosfolípidos de cadena larga, empleados en el desarrollo y producción de bicelas, se pueden seleccionar, sin ser limitante, de la lista que comprende dilauril-fosfatidilcolina (DLPC), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), diestearil-fosfatidilcolina (DSPC) y diaraquidonil-fosfatidilcolina (DAPC), preferiblemente son DMPC y DPPC y aún mas preferiblemente DPPC. De igual manera, el fosfolípido de cadena corta empleado en el desarrollo y producción de bicelas se puede seleccionar, sin ser limitante, de la lista que comprende dipentanoil-fosfatidilcolina (DPePC), dihexanoil-fosfatidilcolina (DHPC), diheptanoil-fosfatidilcolina (DHpPC) y dioctanoil-fosfatidilcolina (DOcPC), siendo preferiblemente dihexanoil-fosfatidilcolina (DHPC).

35

En una realización preferida, la bicela tiene una longitud de eje mayor entre 10 y 80 nm, más preferiblemente incluso entre 15 y 75 nm y, en otra realización preferida, el liposoma tiene un diámetro de entre 200 y 1000 nm más preferiblemente incluso entre 220 y 900 nm.

5

De aquí en adelante, para hacer referencia a cualquier liposoma descrito en párrafos anteriores se puede emplear el término "liposoma de la invención".

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición que comprende el liposoma de la invención, de aquí en adelante "composición de la invención".

15

Los resultados de la invención confirman que la encapsulación de las bicelas formando el liposoma de la invención preserva su estructura bajo dilución, por lo que, si a esto añadimos las propiedades que presentan estas estructuras, el uso de liposomas de la invención sería una buena estrategia tanto para asegurar la estabilidad de las bicelas en todos los tejidos biológicos debido a que en la mayoría el contenido en agua es elevado, como para introducir bicelas a través de fluidos biológicos con alto contenido en agua como, por ejemplo, pero sin limitarse a, el fluido cerebroespinal, la sangre y/o la saliva.

20

25

Por otro lado, los liposomas de la invención tienen la capacidad de encapsular diferentes sustancias de un modo similar a como lo hacen los liposomas, pero con la ventaja de que una vez transportado el fármaco, la penetración de éste en un tejido concreto estará favorecida por el efecto de la estructura discoidal interna de la bicela. Además, la encapsulación y transporte de sustancias hidrofóbicas en los liposomas de la invención está más favorecida por el hecho de que estas estructuras contienen una proporción mayor de bicapa que los liposomas. Así, pueden ser incorporadas sustancias en el interior de las bicelas de forma que estas estructuras se utilicen como transportadores, marcadores, o para cualquier aplicación que considere apropiada un experto en la materia.

30

35

Así, como se ha descrito anteriormente, la microencapsulación en el campo textil es una tecnología novedosa que permite sustituir las dispersiones o

emulsiones de determinadas sustancias por fluidos similares en donde dichos compuestos se encuentran dispersos en el interior de microcápsulas de sustancias inertes, que se fijan al textil por un sistema efectivo. Los liposomas ya han sido ensayados como agentes microencapsulantes, pero debido a que este proceso requiere de un conocimiento físico-químico eficaz de las interacciones existentes a nivel fibra-microcápsula, los liposomas de la invención pueden mejorar de forma significativa las actuales aplicaciones de liposomas en los procesos industriales de tintura de la lana o de cualquier otro material textil aumentando la adsorción, penetración y fijación tanto de colorantes, pigmentos como de otras sustancias utilizadas en este campo de la técnica, y conocidas por cualquier experto en la materia, y que permitan obtener tejidos capaces de realizar diversas funciones, conocidos en la actualidad como “tejidos polifuncionales” o “smart textiles”.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al liposoma de la invención que además contiene un colorante y/o un pigmento, así como a su uso para el encapsulado de colorantes, pigmentos u otras sustancias utilizadas en este campo de la técnica, y conocidas por cualquier experto en la materia, y que permitan obtener tejidos capaces de realizar diversas funciones, conocidos en la actualidad como “tejidos polifuncionales” o “smart textiles”. Estos liposomas de la invención que pueden contener además colorantes y/o pigmentos se pueden utilizar para el tintado de materiales textiles, o pueden contener también otras sustancias utilizadas en la industria textil aumentando así la eficacia de los procesos de tintado de estos materiales textiles.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al liposoma de la invención que además comprende un principio activo, así como a su uso para el encapsulado de al menos un principio activo.

El término “principio activo” hace referencia a cualquier sustancia capaz de provocar un efecto sobre el organismo o a cualquier sustancia capaz de utilizarse para identificación o diagnóstico. La actividad de un principio activo varía debido a la naturaleza de éstos, pero siempre está relacionada con la cantidad ingerida o absorbida.

Así, el principio activo se puede seleccionar de entre la lista que comprende, pero sin limitarse a, agentes marcadores útiles para el diagnóstico como derivados del gadolinio (ácido gadopentético, gadodiamina, ácido gadotérico y gadoteridol), derivados de hierro (hierro III amonio citrato, ferumóxido y hierro III óxido) o derivados de magnesio; agentes antiinflamatorios como diclofenaco, acetaminofeno o ácido flufenámico; antioxidantes como polifenoles (flavonoides), vitaminas (A, E, C), oligoelementos (selenio, zinc), carotenoides (luteína), aminoácidos (teanina) o cafeína; filtros solares como aminobenzoatos, salicilatos, benzofenonas, derivados del dibenzoilmetano, cinamatos o acrilatos; agentes citotóxicos como agentes alquilantes, metotrexato, 6-mercaptopurina, 5-fluoracilo, antibióticos antitumorales o cisplatino y derivados; agentes inmunogénicos; sustancias que signifiquen un aporte exógeno para situaciones patológicas de carencia como vitaminas, hierro, calcio; lípidos epidérmicos de especial importancia para la función barrera de la piel como ceramidas, sulfato de colesterol o ácidos grasos libres; ácidos nucleicos o drogas hidrofóbicas, o mezclas de cualquiera de los anteriores.

En una realización preferida el principio activo se puede seleccionar entre diclofenaco, hierro, gadodiamida, ácido flufenámico, cafeína, ceramidas, sulfato de colesterol o mezclas de ellos.

En esta invención se demuestra que sustancias como la gadodiamida (útil como marcador en resonancia magnética de imagen que permite el seguimiento en todo momento del recorrido de los liposomas de la invención en el interior del organismo), el diclofenaco y el ácido flufenámico (antiinflamatorios de alto espectro), el hierro (habitualmente utilizado para el tratamiento de anemias), la cafeína (usado como antioxidante) y, las ceramidas y el sulfato de colesterol (lípidos responsables de la correcta función barrera de la piel e implicados en diversos mecanismos biológicos) son encapsuladas de forma eficaz en el interior de las bicelas contenidas en los liposomas de la invención.

Esta capacidad de utilizar los liposomas de la invención como vehículos

farmacológicamente activos conduciría al uso de estas estructuras para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sustancia que se está transportando, tratando entre otras, patologías relacionadas con procesos inflamatorios (cuando se encapsulan antiinflamatorios como diclofenaco y ácido flufenámico), enfermedades relacionadas con la deficiencia de hierro y/o vitamina B12 como son la anemia y la enfermedad de Crohn entre otras, lesiones (por regulación de la adhesión plaquetaria), cáncer (cuando se encapsulan agentes citotóxicos), etc. Además, los liposomas de la invención también podrían ser utilizadas en terapia génica dirigiendo el gen defectivo o ausente que está encapsulado a las células diana del paciente.

La alta capacidad permeabilizadora que presentan las bicelas las hace estructuras adecuadas como cosméticos por sus ya probadas propiedades dermatológicas debido a que promueven un refuerzo de los lípidos presentes en el estrato córneo, dando como resultado un aumento de los valores de elasticidad y una mejora de las características del tejido biológico (Barbosa-Barros, L.; Barba, C.; Cócera, M.; Coderch, L.; López-Iglesias, C.; de la Maza, A.; López, O. *Inter. J. Pharmaceut.* 2008, 352, 263) siendo útiles para potenciar la reparación de tejidos dañados por envejecimiento cutáneo, eczemas, sequedad, quemaduras, grietas, manchas y todas aquellas patologías relacionadas con la falta de lípidos en las células del estrato córneo.

Además el encapsulamiento, en el interior de los liposomas de la invención, de agentes cutáneos reparadores, vitaminas, filtros solares u otros principios activos potenciaría las acciones cosméticas de los liposomas.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere al uso del liposoma de la invención, o la composición de la invención, o dicha composición que además comprende un principio activo para la elaboración de un producto cosmético, donde el cosmético se administra por vía tópica.

Se entenderá por "producto cosmético" toda sustancia o formulación de aplicación local a ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo

humano: como, pero sin limitarse, a epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlos en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales. La vía
5 tópica utiliza la piel y las mucosas para la administración del cosmético, lo que incluye las mucosa conjuntival, nasal, oral y urogenital, y además el sistema piloso y capilar, uñas, labios y dientes.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del liposoma de la
10 invención, o la composición de la invención, o dicha composición que además comprende un principio activo para su uso como medicamento.

El liposoma de la invención así como la composición de la invención, conteniendo o no un principio activo, puede usarse para la elaboración de un
15 medicamento para el tratamiento de, pero sin limitarse a, enfermedades de la piel, hepáticas, renales, cardiovasculares, cerebrales, óseas, musculares, tejidos asociados al tracto gastrointestinal, urinario, sistema respiratorio, endocrino, nervioso o tejido auditivo u ocular.

Una realización preferida se refiere al uso del liposoma de la invención, o la
20 composición de la invención, o dicha composición que además comprende un principio activo, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de la piel, tejido nervioso o tejido ocular. En una realización más preferida el medicamento se presenta en una forma adaptada a la
25 administración por vía raquídea o por vía tópica a través de la mucosa conjuntival.

El término "forma adaptada" hace referencia al modo de adecuar el medicamento de la presente invención para que pueda ser administrado por vía raquídea o por
30 vía tópica a través de la mucosa conjuntival.

Otra posibilidad es que el medicamento se presente en una forma adaptada a la administración parenteral, cutánea, oral, epidural, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada. La forma adaptada a la
35 administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su

administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea, pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

Así se abren un gran número de aplicaciones en distintos campos para estas nanoestructuras bicelares.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el liposoma de la invención, o que comprende la composición de la invención, o que comprende dicha composición que además comprende un principio activo. En una realización preferida, la composición farmacéutica además comprende al menos un excipiente farmacológicamente aceptable.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del liposoma de la invención o la composición de la invención, estabiliza dicho compuesto o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores, aromas, texturas y protección que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los

componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

5 El término "farmacológicamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

10 Dentro de las sustancias activas están, por ejemplo, las descritas anteriormente, tanto en una composición junto con los liposomas de la invención o encapsuladas dentro de los liposomas de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al método para obtener el liposoma de la invención, que comprende:

- 15
- a. obtener un film lipídico desecado y una solución acuosa de bicelas,
 - b. hidratar el film lipídico obtenido en el paso (a) con la solución acuosa de bicelas obtenidas en el paso (a),
 - c. aislar y/o purificar el producto obtenido en el paso (b).

20 En una realización más preferida, la obtención del film lipídico desecado del paso (a) comprende:

- i. disolver lípidos en un solvente orgánico a concentraciones entre 5 y 30 mg/ml, y
- ii. eliminar el solvente orgánico del paso anterior.

25

En una realización más preferida, la obtención de la solución acuosa de bicelas del paso (a) comprende:

- 30
- i. disolver en un solvente orgánico fosfolípidos de cadena larga y fosfolípidos de cadena corta cuya razón de las concentraciones molares es de entre 1 y 10,
 - ii. eliminar el solvente orgánico del paso anterior y rehidratar el producto obtenido con solución acuosa hasta conseguir una concentración de lípidos de entre 15 y 25% peso/volumen.

35

En una realización aún más preferida el fosfolípido de cadena larga es dimiristoil-fosfatidilcolina o dipalmitoil- fosfatidilcolina y el fosfolípido de cadena corta es dihexanoil- fosfatidilcolina.

5 La solución final debe ser transparente, para ello, la metodología de preparación requiere la consecución de una serie de pasos que han sido optimizados, los cuales incluyen tratamientos con ultrasonidos durante tiempos que oscilan entre 5 minutos y 5 horas, a temperaturas entre 5-60°C y potencias entre 100 y 600W y un específico proceso de centrifugación tal
10 como se describe en el siguiente párrafo, con el fin de separar/purificar los liposomas de la invención de otros agregados lipídicos que hayan podido formarse.

Un paso importante una vez se obtienen el film lipídico desecado, la solución acuosa de bicelas y se hidrata el film lipídico con la solución de bicelas, es la
15 purificación, de las estructuras obtenidas, por centrifugación entre 15000xg y 30000xg preferiblemente 20000xg durante periodos entre 120 y 15 min más preferiblemente 45 min. Condiciones más o menos drásticas conducirían a sistemas formados por mezclas de agregados. Otros sistemas de
20 purificación/separación que impliquen diluciones, como son las resinas de exclusión de tamaño podrían provocar la transición de bicelas no encapsuladas, a vesículas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y
25 sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas tales como morfología, topología, fluidez, viscosidad, heterogeneidad de las estructuras resultantes, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las
30 siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **FIG. 1. Estructura de una bicela.**

Muestra los dos tipos de fosfolípidos que debe poseer una bicela en cada una de sus zonas diferenciando para ello la zona de los extremos de la zona central plana.

5 **FIG. 2. Microfotografías representativas de muestras bicelares antes (A) y después (B) de la dilución.**

En la Figura 2A (bicelas) las bicelas se muestran en todas las proyecciones: de frente (flecha blanca) y lateralmente (flecha negro).

10 En la Figura 2B (bicelas diluidas) se observan vesículas esféricas unilamelares que muestran una gran variedad de tamaños (de 30 a 250 nm).

FIG. 3. Micrografías obtenidas por cryo-TEM de liposomas de la invención (liposomas y bicelas).

15 En la Figura 3 se observaron dos tipos de estructuras: estructuras pequeñas de aproximadamente 20 nm, y otras mayores de tamaño entre 100 y 200 nm.

La Figura 3A muestra una vista general de la muestra de liposomas de la invención en la cual se ven una gran cantidad de bicelas. Es de resaltar la gran adherencia de la mayoría de las bicelas sobre el carbono (zona señalada en la Fig. 3A con un asterisco). Estas bicelas mostraron principalmente la proyección lateral.

20 La Figura 3B muestra bicelas encapsuladas, en sus dos proyecciones (flechas blancas) y bicelas no encapsuladas (flechas negras). Algunas de las bicelas encapsuladas mostraron un aumento de tamaño (alrededor de 100 nm) con respecto a las no encapsuladas (20 nm), ver Figura. 3A.

La Figura 3C muestra bicelas apiladas cara a cara dentro de los liposomas.

30

FIG. 4. Micrografías obtenidas por cryo-TEM de liposomas de la invención diluídos (liposomas y bicelas).

La Figura 4A muestra una alta variabilidad de vesículas en la muestra diluida: liposomas vacíos (flechas negras); liposomas dentro de otros liposomas llamados vesículas oligo-lamelares (punta de flecha blanca); vesículas

35

multilamelares (flechas en blanco) y liposomas con bicelas dentro o liposomas de la invención (punta de flecha negra).

La Figura 4B muestra liposomas multilamelares.

5

La Figura 4C muestra acumulaciones de bicelas dentro de liposomas como en las muestras tras la dilución (Fig. 3C).

La Figura 4D muestra en detalle bicelas apiladas dentro de los liposomas multilamelares.

10

FIG 5. Visualización por MRI de inyección intra-cerebro-ventricular de bicelas conteniendo gadodiamida.

La Figura 5A muestra la visión coronal del cerebro de rata sano.

15

La Figura 5B muestra la visión coronal del cerebro de rata inyectado con la muestra de bicelas conteniendo gadodiamida.

FIG. 6. Visualización por MRI de inyección intra-cerebro-ventricular de bicelas conteniendo gadodiamida encapsuladas en liposomas.

20

La Figura 6A muestra una vista sagital de cerebro de rata sana (primera imagen) e inyectada con la muestra de liposomas de la invención (liposomas que contenían en su interior bicelas de Gadodiamida) a las 0h, 4h, 8h y 24 horas después de la inyección (cuatro imágenes siguientes).

25

La Figura 6B muestra la hiper-intensidad inducida por gadodiamida que se cuantificó dibujando un entorno de una zona anatómica que contenía fluido cerebroespinal (CSF) a distintos tiempos. Detalle de la región de interés.

La Figura 6C muestra la intensidad de señal del LCR (normalizada frente a intensidad muscular) para una rata de control (barra blanca) y la rata inyectada con liposomas que contenían bicelas con gadodiamida (barras negro) en diferentes tiempos después de la inyección. Representación para observar la evolución de la hiper-intensidad en el tiempo.

30
35

FIG. 7. Micrografías obtenidas con TEM (microscopio electrónico de transmisión) de mucosa oral porcina.

La figura 7A muestra una imagen de la mucosa sin tratar y la figura 7B muestra el tejido después del tratamiento con los liposomas de la invención que contienen nistatina. No se observan cambios estructurales que puedan asociarse al deterioro del tejido.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la preparación de los liposomas de la invención, su caracterización mediante espectroscopia de correlación fotónica (DLS) y criomicroscopía electrónica de transmisión (Cryo-TEM) y el efecto de la introducción de estos sistemas en dos ratas Wistar por inyección intracerebroventricular por visualización MRI. En todos los ensayos se pone a prueba la estabilidad de la bicelas en ambientes diluidos a fin de utilizar estas nano-estructuras a través de vías sistémicas que impliquen un alto contenido en agua.

En estos ejemplos el término “sistema” se refiere a las propias bicelas o a los liposomas que comprenden bicelas en su interior.

EJEMPLO 1. Preparación de sistemas.

1.1 Bicelas.

Se eligió para su preparación la mezcla compuesta por DPPC/DHPC. La razón de esta elección es debida a que en los intervalos de temperatura de trabajo (de 25 a 37 °C) las bicelas compuestas por DPPC/DHPC no experimentan los cambios observados en las bicelas compuestas por DHPC en combinación con otro fosfolípido de cadena larga. Este hecho encuentra su explicación en que el DPPC posee una T_m de 41 °C, temperatura significativamente superior a la temperatura de trabajo usada en la presente invención, con lo que se confirma que la transición en la estructura de una bicela ocurre a temperaturas superiores a la temperatura de transición de los lípidos que la forman.

Las muestras se prepararon mezclando cantidades apropiadas de DPPC en polvo y una solución clorofórmica de DHPC hasta alcanzar una razón molar DPPC/DHPC de $q = 3.5$. Una vez mezclados los componentes, el cloroformo se eliminó por medio de un rotavapor y los sistemas resultantes se hidrataron con una solución del marcador paramagnético gadodiamida hasta alcanzar el 20% (peso/volumen) de la concentración total de lípido. Las soluciones bicelares se prepararon sometiendo a las muestras a varios ciclos de sonicación y congelación hasta que las muestras llegaron a ser transparentes.

10 1.2 Bicelas encapsuladas en liposomas: Liposomas de la invención.

La composición de los liposomas utilizados fue de 80% Lipoid S-100 y del 20% de colesterol. Estos dos componentes se mezclaron en cloroformo y a continuación se formó un film lipídico eliminando el cloroformo con rotavapor. El film formado se hidrató con la solución bicelar previamente formada. Esta solución se extruyó tres veces a través de una membrana de policarbonato de 800 nm. La solución de liposomas se centrifugó durante 45 minutos a 20000 x g en una centrífuga Heareus con un rotor JA-20. El sobrenadante se separó y el pelet, se resuspendió hasta obtener el volumen inicial con NaCl 0.9% a fin de mantener la misma concentración de lípido. Este procedimiento se repitió 3 veces. Así fue posible separar las gadodiamida encapsulada de la no encapsulada en el sistema lipídico.

EJEMPLO 2. Caracterización de los sistemas.

25 A fin de evaluar el efecto de la dilución en los sistemas, las muestras se analizaron utilizando las técnicas de espectroscopia DLS y Cryo-TEM antes y después de la dilución. La primera técnica se utilizó para determinar el tamaño medio de los sistemas, mientras que la segunda fue muy útil para la caracterización de aspectos dimensionales y morfológicos de las nano-estructuras y para proporcionar una visualización directa de las muestras de los lípidos.

2.1 Espectroscopia de correlación fotónica (DLS)

35 El diámetro hidrodinámico (HD) y el índice de polidispersidad (PI) se determinaron usando el aparato Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Systems, Southborough, MA).

Las medidas de DLS consideran el movimiento Browniano de las partículas y correlaciona esta lectura con los tamaños de partícula. La relación entre el tamaño de partícula y su velocidad debida al movimiento Browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein:

$$5 \quad HD = kT/3 \pi \eta D$$

donde:

HD es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión translacional (m^2/s), k es la constante de Boltzmann ($1.3806503 \times 10^{-23} m^2 kg s^{-2} K^{-1}$), T es la temperatura absoluta (K) y η es la viscosidad (mPa.s). Los diferentes tamaños de los sistemas se determinaron por detección y análisis de la luz dispersada cuando el rayo láser de He/Ne de 632 nm atraviesa la muestra.

La interpretación de los datos se realizó considerando la distribución de tamaños por intensidad y por volumen de la luz dispersada. El uso de esta metodología, que considera que partículas con diferentes tamaños difunden diferente intensidad de luz, es especialmente útil en muestras que presentan alta heterogeneidad de tamaños. Las medidas por DLS se realizaron a 25 y 37° C a fin de observar las características de los sistemas a temperaturas ambiente y fisiológica.

Los datos obtenidos a temperatura ambiente se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. HD y proporción de las poblaciones de partículas analizadas por intensidad y volumen de luz dispersada

		INTENSIDAD		VOLUMEN	
		HD (nm)	% Intensidad	HD (nm)	% Volumen
Bice	Pico 1	19.5	91.3	16.3	93.9
Lipo Inv	Pico 1	92	100	11.9	100
Bice Dil	Pico 1	255	88.4	256	3.6
	Pico 2	26.8	11.6	26.6	96.4
Lipo Inv Dil	Pico 1	800	86.3	850	59.8
	Pico 2	72.4	13.7	68.7	40.2

Datos obtenidos con el software proporcionado por la empresa Malvern Instruments.

Los HDs para bicelas DPPC/DHPC (Bice) fueron de 19.5 nm y 16.3 nm estimados por intensidad y por volumen respectivamente, con una proporción de luz dispersada superior al 90% en ambos análisis.

5

La muestra conteniendo bicelas se diluyó del 20% (concentración inicial) al 0.07 % (concentración final) para saber el efecto de la dilución sobre la estructura bicelar. Al diluir la muestra (Bice Dil) se observaron en ambos análisis (por intensidad y por volumen), dos poblaciones de partículas una de un tamaño alrededor de 26 nm y la otra alrededor de 255 nm. Las proporciones de luz dispersada analizadas por intensidad y por volumen fueron diferentes. Esto es debido a que las partículas grandes y pequeñas contribuyen de forma diferente a la intensidad de la luz dispersada. Así, las partículas grandes dispersan mayor intensidad de luz que las pequeñas. Por esta razón en los sistemas de tamaños heterogéneos el análisis por intensidad dio lugar a una proporción mayor de partículas grandes, como puede apreciarse en la Tabla 1. El análisis simultáneo por volumen indicó mayor proporción de partículas pequeñas (96,4%) que de partículas grandes (3,6%), indicando la presencia predominante de partículas pequeñas en el sistema, aunque la intensidad de luz dispersada para partículas grandes (88,4%) fuera mayor que para las pequeñas (11,6%).

10
15
20

Los valores de PI para los sistemas bicelares fueron respectivamente 0.452 y 0.714, antes y después de la dilución. Así, al diluir la muestra el tamaño de las poblaciones aumentó y las muestras fueron más heterogéneas.

25

Con todo, es necesario considerar que en esta técnica, el tamaño de las partículas se aproxima al de una hipotética esfera que difunde con la misma velocidad que la partícula del experimento. Como la estructura bicelar tiene forma de disco, el tamaño de las partículas obtenidas por el DSL proporciona una medición relativa de las dimensiones de la estructura. Por lo tanto, estos datos deben interpretarse teniendo en cuenta también las imágenes de cryo-TEM que se analizan en el apartado 2.2.

30

Los resultados obtenidos por DSL para bicelas encapsuladas en liposomas, (liposomas de la invención, Lipo Inv) se muestran en la Tabla 1. El análisis por

35

intensidad y por volumen (ambos con una proporción de la luz dispersada de 100%) sólo mostró un pico. El HD analizado por intensidad fue de 92 nm y el de volumen 11,9 nm. Como ya se ha mencionado, estas diferencias se deben a que las partículas grandes (92 nm) dispersaron mucha más intensidad de luz que las partículas pequeñas (11,9 nm). Por esta razón en el análisis de intensidad sólo se observó el pico que se corresponde con las partículas grandes. Al analizar las muestras por volumen, se observó una gran contribución de las partículas pequeñas que podía ocultar la pequeña contribución al volumen de las partículas de gran tamaño con lo que se vió sólo un pico, que correspondía con la contribución de las pequeñas partículas. Por lo tanto, dos tipos de estructuras estuvieron presentes, aunque sólo se observó un pico para cada análisis. Se describen a continuación (apartado 2.2) los resultados obtenidos por microscopia a fin de aclarar esta interpretación.

Cuando se diluyó la muestra de liposomas de la invención (Lipo Inv Dil.) se observaron claramente dos picos (Tabla 1). En general, las estructuras se hicieron más grandes con diámetros de 800 nm (86,3%) y 72,4 nm (13,7%) por intensidad y 850 nm (59,8%) y 68,7 nm (40,2%) por volumen. Los valores de PI también aumentaron de 0,420 a 0,612 antes y después de la dilución, respectivamente.

Los datos de DLS a 37 ° C no mostraron cambios en comparación con los resultados a temperatura ambiente.

2.2 Crio-microscopía electrónica de transmisión (Cryo-TEM)

Los liposomas y bicelas se visualizaron por el método de Cryo-TEM. Se formó una fina película acuosa por extracción de la muestra de la suspensión colocada sobre una rejilla. Para ello se utilizaron rejillas de carbono. Después de retirar parte de la suspensión de la rejilla se secó con papel de filtro, quedando una película de muestra sobre la rejilla. Estas películas fueron vitrificadas sumergiendo la rejilla en etano, que se mantuvo en su punto de fusión con nitrógeno líquido (según técnica descrita en Honeywell-Nguyen, P. L.; Frederik, P. M.; Bomans, P. H.; Junginger, H. E.; Bouwstra, J. A. *Pharm Res* 2002, 19, 991) con un Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, Holanda) y manteniendo las muestras antes de la congelación a 100% de humedad. La temperatura a la que se inició la

5 vitrificación de las películas delgadas fue temperatura ambiente. Las muestras vítreas fueron trasladadas a un microscopio Tecnai F20 (FEI Company, Eindhoven, Holanda) con un cryotransfert Gatan (Barcelona, España). La visualización fue realizada a 200 kV, a una temperatura de entre -170 ° C y -175 ° C usando las condiciones para baja densidad de imagen

10 En las imágenes se obtiene una visualización directa de la estructura bicelar. Todas las mediciones se obtuvieron por DLS a temperaturas ambiente y fisiológica, (25°C y 37°C) y no se detectó ninguna modificación en el tamaño por causa de la temperatura. Dado que la temperatura no tuvo efecto sobre estos sistemas, los experimentos de cryo-TEM sólo se realizaron para muestras crio-fijadas desde la temperatura ambiente. Algunas micrografías representativas de las muestras antes (muestra de bicelas) y después (muestra de bicelas diluidas) de la dilución se muestran en las Figuras 2A y B, respectivamente.

15 Las imágenes confirmaron los resultados obtenidos por DLS, demostrando que el tamaño de las estructuras en la muestra de bicelas, alrededor en todos los casos de 20 nm., fue menor que el tamaño de las estructuras en la muestra de bicelas diluidas, que mostraron tamaños que iban desde 30 nm. a 250 nm. Además, la morfología de las partículas también cambió con la dilución (ver Figura 2). Este hecho coincide con los valores de PI altos (0,714) observados por DLS. Así, el DLS y la microscopía muestran una transición del sistema de discos bicelares a vesículas, transición causada por el efecto de la dilución.

20 A fin de investigar la morfología de estos sistemas, las muestras de liposomas de la invención y de liposomas de la invención diluidos se analizaron por cryo-TEM. También en este caso las muestras para observación microscópica solamente se crio-fijaron a temperatura ambiente. Micrografías obtenidas por cryo-TEM se muestran en las Figuras 3 y 4.

30 La variedad de tamaños, entre 70 nm y 600 nm, presente en estas imágenes confirma la alta PI (0.612) en la muestra de liposomas de la invención diluidos. Mientras que las estructuras pequeñas corresponden a bicelas discoidales, las mayores corresponden a liposomas unilamelares. Estas micrografías confirman la interpretación de los resultados de DLS para muestras de los

35

liposomas de la invención debido a que, aunque sólo se detectó un pico por análisis de volumen e intensidad (Tabla 1), se observaron dos tipos de estructuras. Sin embargo, los resultados también indicaron una alta conservación estructural de las bicelas encapsuladas independientemente del proceso de dilución debido a que las muestras de liposomas de la invención diluidos sólo se observaron dentro de los liposomas, no son visualizadas bicelas libres (ver Figura 4).

EJEMPLO 3: Incorporación de diferentes sustancias en los sistemas

Las sustancias que se incorporaron en los sistemas fueron: hierro (como cloruro de hierro a una concentración del 50%), ceramidas (10 y 20%), cafeína (10%), gadodiamida (60%), sulfato de colesterol (20%), diclofenaco (1.16%) y ácido flufenámico 1%). La incorporación se hizo en la fase de realización de las bicelas. Dependiendo del carácter hidrófilo o lipófilo de la sustancia, ésta se añadió junto con los lípidos formadores de la bicela en la fase clorofórmica o junto con el agua de hidratación. Se eligieron para estas preparaciones las mezclas compuestas por DPPC/DHPC, DMPC/DHPC y DOPC/DHPC. El DOPC es dioleoilfosfatidilcolina. Se trabajó con razones molares de concentraciones de los dos lípidos de 2 a 3.5.

Las muestras se sometieron a entre 10 y 50 ciclos de sonicación en baño de ultrasonidos 5 minutos y congelación 5 minutos hasta que llegaron a ser transparentes. Estas bicelas con las sustancias contenidas en su interior, se encapsularon en liposomas de la manera descrita en el ejemplo 1 y se caracterizaron siguiendo los métodos descritos en el ejemplo 2.

EJEMPLO 4: Uso de los sistemas de la invención para su uso en productos de aplicación ocular.

Un compuesto con efecto terapéutico en el tratamiento de sensibilizaciones de la mucosa conjuntival, fue incorporado en los sistemas de la invención como describe el ejemplo 3. Se comprobó mediante microscopía óptica que este compuesto, que había sido imposible de dispersar utilizando otros sistemas de emulsión (siempre cristalizaba formando estructuras muy grandes), se mantenía disperso sin formar ningún agregado cuando era incorporado en los sistemas de

la invención. Este hecho resultó ser todo un éxito, ya que la formación de cristales siempre impedía su uso para aplicación ocular. Los sistemas de la invención conteniendo dicho compuesto fueron aplicados en ojos de animales de experimentación y se comprobó por microscopía óptica que los cristales tampoco se formaban al entrar en contacto con el entorno acuoso del ojo.

Además se realizaron ensayos de estabilidad y de actividad del citado compuesto, y se verificó que éste se mantenía estable y activo después de su incorporación a los sistemas de la invención.

10

EJEMPLO 5. Experimentos “in vivo”: Agente de visualización de contraste por Resonancia Magnética de Imagen (MRI)

Además, se realizaron experimentos “in vivo” para conocer la estabilidad de estas nuevas estructuras. Se incluyó en estos sistemas el agente de contraste paramagnético gadodiamida. Este agente fue inyectado en el sistema ventricular del cerebro de rata y se visualizó por resonancia magnética (MRI). Indujo una hiper-intensidad que fue cuantificada mediante la definición de una región de interés (ROI) en el compartimento de líquido cefalorraquídeo (LCR).

20

3.1 Animales

Los experimentos de MRI se realizaron en dos ratas Wistar (machos adultos de peso 250-275 g.) Las ratas se acondicionaron a temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad ($55\pm 10\%$) controladas, con ciclos de 12-h de luz/12-h de oscuridad (luz entre 6:00 AM y 6:00 PM). Se les suministró alimento y agua *ad libitum* durante el acondicionamiento. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas de la “National Institute of Health Animal Protection Guidelines” y fueron aprobadas por las autoridades del Comité Local de Bioética.

30

3.2 Inyecciones Stereotaxias.

Los animales fueron previamente anestesiados con 4% isoflurano en $\text{O}_2:\text{N}_2\text{O}$ (3:7, cantidad que se redujo al 1% de isoflurano durante el mantenimiento, y se colocaron en un aparato estereotáctico (Stoelting, EE.UU.). La sutura sagital, y la

35

superficie del cerebro fueron utilizadas como referencias para las coordenadas anteroposteriores (AP), medio-laterales (ML), y dorso-ventrales (DV), respectivamente. Se practicó un agujero en el cráneo de la rata para inyectar la solución en el ventrículo lateral en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP: 5 -0,04 mm; ML: -0,12 mm; DV: -0,37 mm de la Bregma. Cantidades de 50 μ l de una solución acuosa conteniendo dos preparaciones diferentes de bicelas (una formada por bicelas libres y otra formada por los liposomas de la invención) mezcladas con gadodiamida fueron inyectadas con una jeringa de 100 μ l Hamilton equipada con una aguja de 32G, a un ritmo de inyección de 2 μ l /min.

10

Después de la inyección, la aguja se dejó en el lugar durante 5 minutos para evitar fugas. Al final de la cirugía, la piel se suturó y el animal fue trasladado a la base del escáner para la obtención de imágenes de RM. La gadodiamida se inyectó tanto en la solución de bicelas como en la de liposomas de la invención.

15

La concentración de bicelas que se utilizó para la inyección fue de 200 mg/ml. El investigador que llevó a cabo la administración estereotáxica poseía una gran experiencia en este procedimiento.

3.3 Resonancia Magnética de Imagen (MRI) "in vivo".

20

Se realizaron barridos de RM bajo anestesia con isoflurano en un escáner 70/30 BioSpec horizontal para animales (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania), equipado con un diámetro interior de 12 cm activamente blindado y con un sistema de gradiente (400 mT/m). El anillo de configuración consistió en una bobina de transmisión/recepción. Los animales fueron colocados en posición supina en un soporte de plexiglás con un cono nasal para la administración de gases anestésicos, fijada con una barra a los dientes, tapones para los oídos y cinta adhesiva. Las exploraciones Tripilot se utilizaron para la colocación exacta de la cabeza del animal en el interior del imán. La cabeza del animal fue colocada de tal forma que aproximadamente el centro del cerebro coincidiera con el isocentro del imán. Se realizó una secuencia de imágenes T1-ponderadas axiales sagitales con un flash convencional (Fast Low Angle Shot imágenes). Los parámetros de exploración de las imágenes sagitales fueron: tiempo de repetición (TR) = 350 ms, tiempo de eco (TE) = 5,4 ms, 2 medias, el grosor de corte = 1 mm, el número de cortes contiguos = 15, campo de visión (FOV) = 4 \times 4 cm², y la matriz = 256 \times

35

256 × 15 píxeles, resultando en una resolución espacial de 0,156 × 0,156 mm en 1 mm de espesor del corte. Además, los mapas T1 con orientación axial fueron realizados con RAREVTR (adquisición rápida con el mejoramiento de la relajación y el tiempo variable de repetición) de secuencia. Los parámetros de exploración
5 fueron: TR=182,412 ms, 200 ms, 500 ms, 700 ms, 1000 ms, 1400 ms, 2000 ms, 3000 ms, 6000 ms, TE = 10 ms, con un grosor de corte = 1 mm, el número de cortes contiguos = 12, FOV = 3 × 3 cm², y la matriz = 128 × 128 × 12 píxeles, resultando en una resolución espacial de 0,234 × 0,234 mm en 1 mm de espesor del corte. La toma de imágenes se realizó justo después de la inyección y a 4,8 y
10 24 horas más tarde.

3.4 Análisis de imágenes.

Se determinó una región de interés (ROI) que se delimitó en el compartimento
15 líquido cefalorraquídeo (LCR) de cada imagen para evaluar el aumento de la señal producida por la gadodiamida. Se normalizó la señal y se realizó el análisis estadístico mediante la prueba t de Student emparejado (un valor de p <0,05 fue considerado significativo).

Cuando lo que se inyectó fueron bicelas libres, cinco minutos después del
20 final de la infusión de las bicelas ambos animales murieron, debido a la drástica expansión a las que se vieron sometidas las bicelas en todo el sistema cerebro-ventricular de la rata, y el análisis de MRI se realizó "post-mortem". La Figura 5 muestra la visión coronal del cerebro de rata sano (A) y el inyectado con la muestra de bicelas (B). Puede observarse que las bicelas
25 libres cursaron con una drástica expansión en todo el sistema cerebro-ventricular de la rata lo que le produjo la muerte después de la inyección.

En el caso de inyectar bicelas encapsuladas, se aplicaron inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v) en ratas a fin de observar el aumento de la
30 intensidad de la señal de gadodiamida en el CSF por administración de muestras de liposomas de la invención. La rata se inyectó utilizando el mismo procedimiento experimental. El animal se escaneó inmediatamente y transcurridas 4h, 8h y 24h. En contraste con la administración de la muestra bicelar, el animal que recibió la muestra de bicelas encapsuladas o liposomas
35 de la invención sobrevivió. Dicha preparación no presentó ningún efecto

aparentemente tóxico observándose un efecto dependiente del tiempo con una hiperintensidad máxima de la señal en el CSF en el análisis realizado inmediatamente después de la infusión de la preparación de liposomas de la invención y una disminución progresiva de la señal con el tiempo. A las 24 horas la intensidad fue similar a la que se encontró en animales sanos (control) (ver Figura 6).

Teniendo en cuenta que los liposomas de la invención tienen un mayor tamaño que las bicelas en ambientes diluidos y aún así permitieron la supervivencia de los animales, el hecho de que la inyección intracerebroventricular de bicelas libres resultara letal para las ratas se explica debido a los rápidos e incontrolados cambios morfológicos que experimentan estas estructuras en contacto con ambientes diluidos como es el fluido cerebroespinal. Estas repentinas transiciones morfológicas son, por tanto, la causa de que cambie la composición en el fluido cerebroespinal y se promueva la expansión del sistema cerebroventricular.

EJEMPLO 6: Uso de los sistemas de la invención para su uso en tratamientos antimicóticos de la mucosa oral.

La molécula nistatina fue incorporada en los sistemas de la invención como describe el ejemplo 3. Concretamente en los sistemas que contenían DPPC/DHPC. La composición también incluía, una mezcla de fosfolípidos de Lipoid S-100 y colesterol al 20%. La nistatina tiene actividad antibiotica antifúngica y es utilizado frecuentemente en infecciones cutáneas y mucosas originadas por la especie de hongo *Candida albicans*. La cantidad de nistatina incorporada en el sistema de la invención fue del mismo orden que la presente en los productos que contienen nistatina en suspensión actualmente comercializados, unos 15,75 mg/ml. Este hecho resultó ser todo un éxito, ya que los sistemas de la invención tienen un alto contenido en agua y se conoce la dificultad de incorporar la nistatina en sistemas de estas características (alto contenido en agua).

Los sistemas de la invención conteniendo nistatina fueron aplicados en mucosa oral porcina realizando experimentos *in Vitro* de absorción utilizando células de Franz y tras un periodo de contacto con la mucosa de tres horas

se determinó mediante cromatografía líquida de alto desarrollo (HPLC) la cantidad de nistatina retenida en el tejido. Se vió que toda la nistatina aplicada (629 microgramos) estaba incorporada en el tejido, hecho muy conveniente cuando el objetivo es tratar afecciones provocadas por hongos.

5 Además, se verificó mediante microscopía electrónica de transmisión que el tejido de la mucosa oral no había sido dañado significativamente por efecto del tratamiento (FIGURA 7).

También se determinó que la actividad microbiológica de la nistatina no quedaba afectada por el hecho de ser incorporada en los liposomas de la
10 invención siendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 16 µg/ml

REIVINDICACIONES

1. Liposoma caracterizado porque comprende, en su solución acuosa interna, al menos una bicela.
5
2. Liposoma según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende bicelas en una concentración de entre el 5 y 25 % en peso seco con respecto al liposoma final.
- 10 3. Liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque comprende lípidos que tienen una temperatura de transición media de entre 4 y 40 °C.
- 15 4. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las bicelas comprenden fosfolípidos de cadena larga en su región central plana y fosfolípidos de cadena corta en las regiones de los extremos.
- 20 5. Liposoma según la reivindicación 4, caracterizado porque las bicelas comprenden fosfolípidos con una razón de concentraciones molares entre los fosfolípidos de cadena larga y los de cadena corta de entre 1 y 10.
- 25 6. Liposoma según la reivindicación 4, caracterizado porque los fosfolípidos comprenden cadenas con una diferencia entre el número de carbonos entre cualquier cadena larga y cualquier cadena corta de entre 5 y 25.
- 30 7. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque el fosfolípido de cadena larga es dimiristoil-fosfatidilcolina o dipalmitoil-fosfatidilcolina.
8. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque el fosfolípido de cadena corta es dihexanoil-fosfatidilcolina.
- 35 9. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

caracterizado porque la bicela tiene una longitud de eje mayor de entre 10 y 80 nm.

5 10.Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el liposoma tiene un diámetro de entre 200 y 1000 nm.

10 11.Liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 caracterizado porque además comprende al menos un principio activo.

12. Liposoma según la reivindicación 11 caracterizado porque el principio activo se selecciona entre diclofenaco, hierro, gadodiamida, ácido flufenámico, cafeína, ceramidas, sulfato de colesterol y mezclas de ellos.

15 13.Liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que además contiene un colorante y/o un pigmento.

20 14.Composición caracterizada porque comprende el liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Uso del liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el encapsulado de al menos un principio activo.

25 16.Uso del liposoma según la reivindicación 15 caracterizado porque el principio activo se selecciona entre diclofenaco, hierro, gadodiamida, ácido flufenámico, cafeína, ceramidas, sulfato de colesterol y mezclas de ellos.

30 17.Uso del liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el encapsulado de colorantes y/o pigmentos.

18.Uso del liposoma definido en la reivindicación 13 o de la composición según la reivindicación 14 para el tintado de materiales textiles.

35 19.Uso del liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de la composición definida en la reivindicación 14 para la elaboración de

un producto cosmético.

20. Uso según la reivindicación 19, caracterizado porque el cosmético se administra por vía tópica.

5

21. Liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición definida en la reivindicación 14, para su uso como medicamento.

10

22. Uso del liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición definida en la reivindicación 14 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de la piel, tejido nervioso o tejido ocular.

15

23. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, caracterizado porque el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración por vía raquídea o por vía tópica a través de la mucosa conjuntival.

20

24. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende el liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o composición según la reivindicación 14.

25

25. Composición farmacéutica según la reivindicación 25, caracterizada porque además comprende, al menos, un excipiente farmacológicamente aceptable.

30

26. Método para la obtención del liposoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque comprende:

- a. obtener un film lipídico desecado y una solución acuosa de bicelas,
- b. hidratar el film lipídico con la solución de bicelas obtenidos ambos en el paso (a),
- c. aislar y/o purificar el producto obtenido en el paso (b).

35

27. Método para la obtención del liposoma definido en la reivindicación 26,

caracterizado porque la obtención del film lipídico desecado del paso (a) comprende:

- i. disolver lípidos en un solvente orgánico, a concentraciones entre 5-30mg/ml y
- 5 ii. eliminar el solvente orgánico del paso anterior.

28.Método para la obtención del liposoma según la reivindicación 26 caracterizado porque la obtención de la solución acuosa de bicelas del paso (a) comprende:

- 10 i. disolver en un solvente orgánico fosfolípidos de cadena larga y fosfolípidos de cadena corta cuya razón de las concentraciones molares es de entre 1 y 10,
- ii. eliminar el solvente orgánico del paso anterior y rehidratar el producto obtenido con solución acuosa hasta conseguir una
- 15 concentración de lípidos de entre 15 y 25% peso/volumen.

29.Método según la reivindicación 28, caracterizado porque el fosfolípido de cadena larga es dimiristoil-fosfatidilcolina o dipalmitoil-fosfatidilcolina y el fosfolípido de cadena corta es dihexanoil- fosfatidilcolina.

20

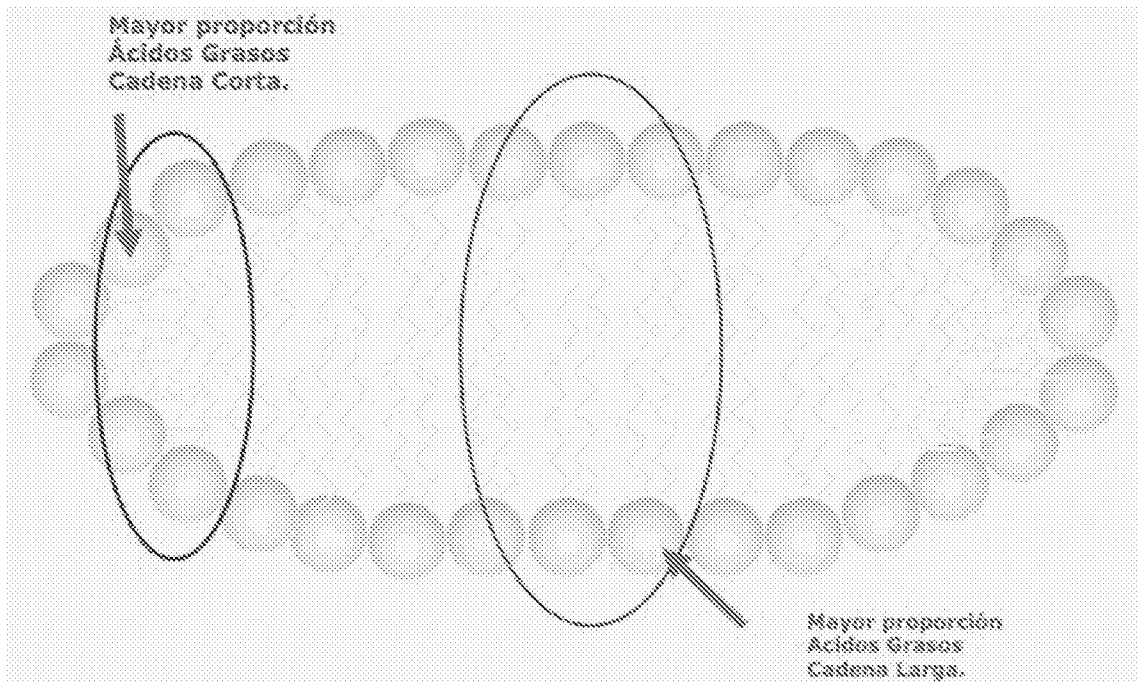


FIG. 1

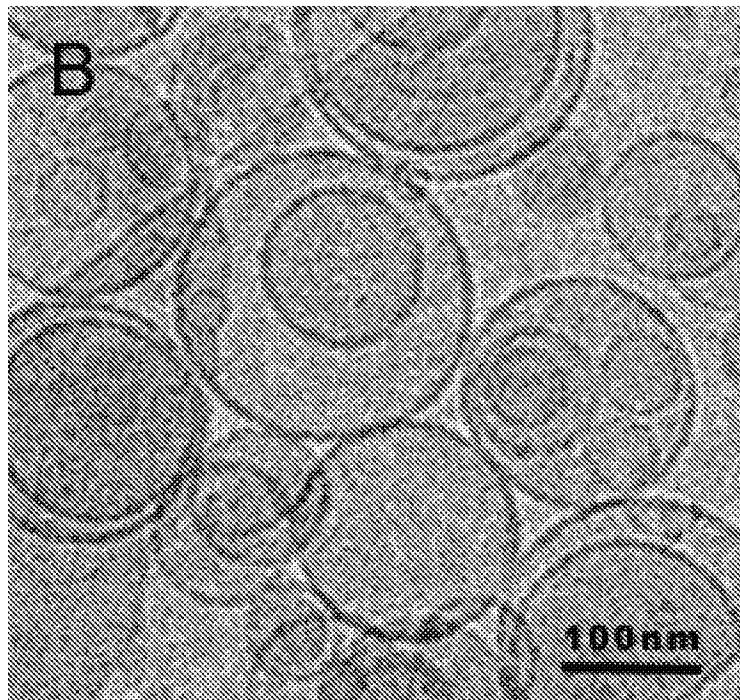
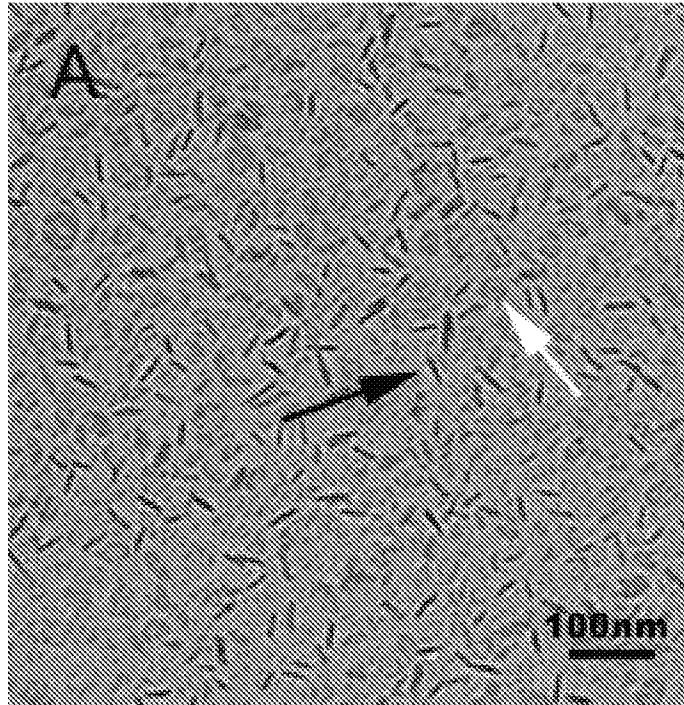


FIG. 2

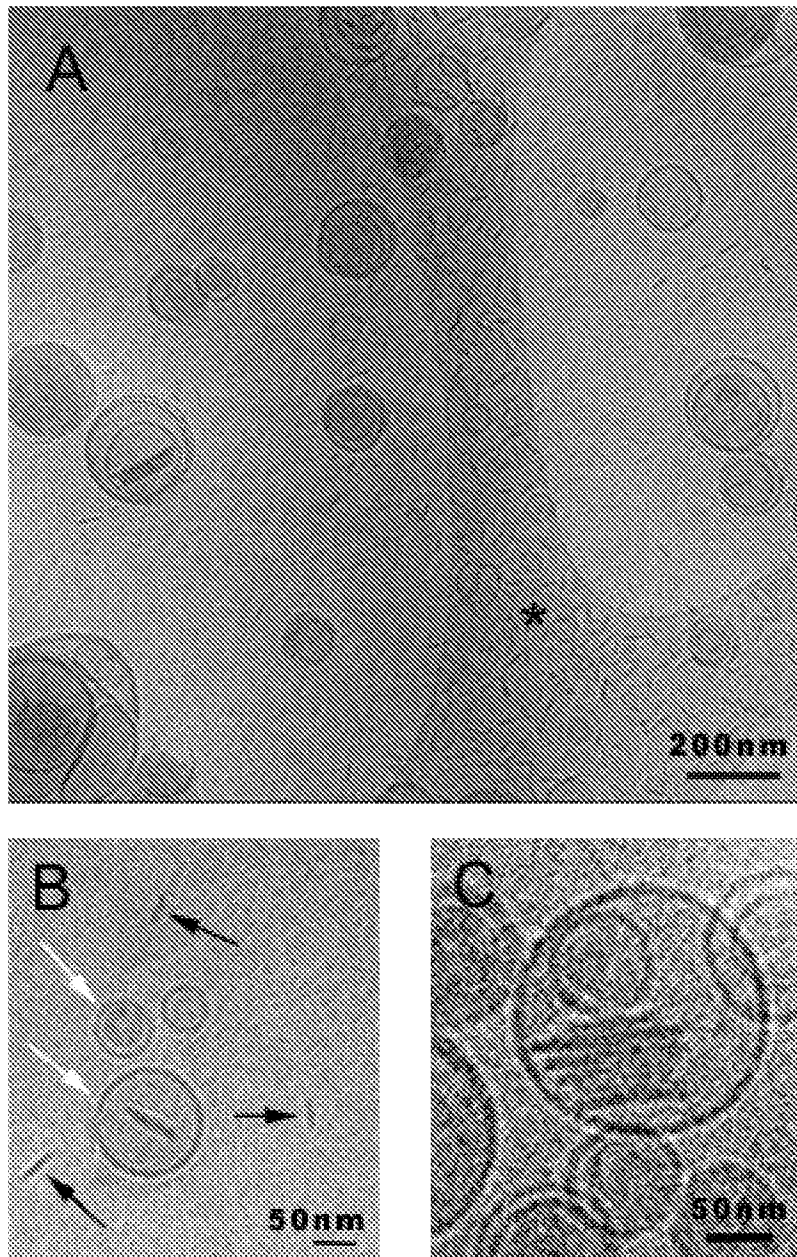


FIG. 3

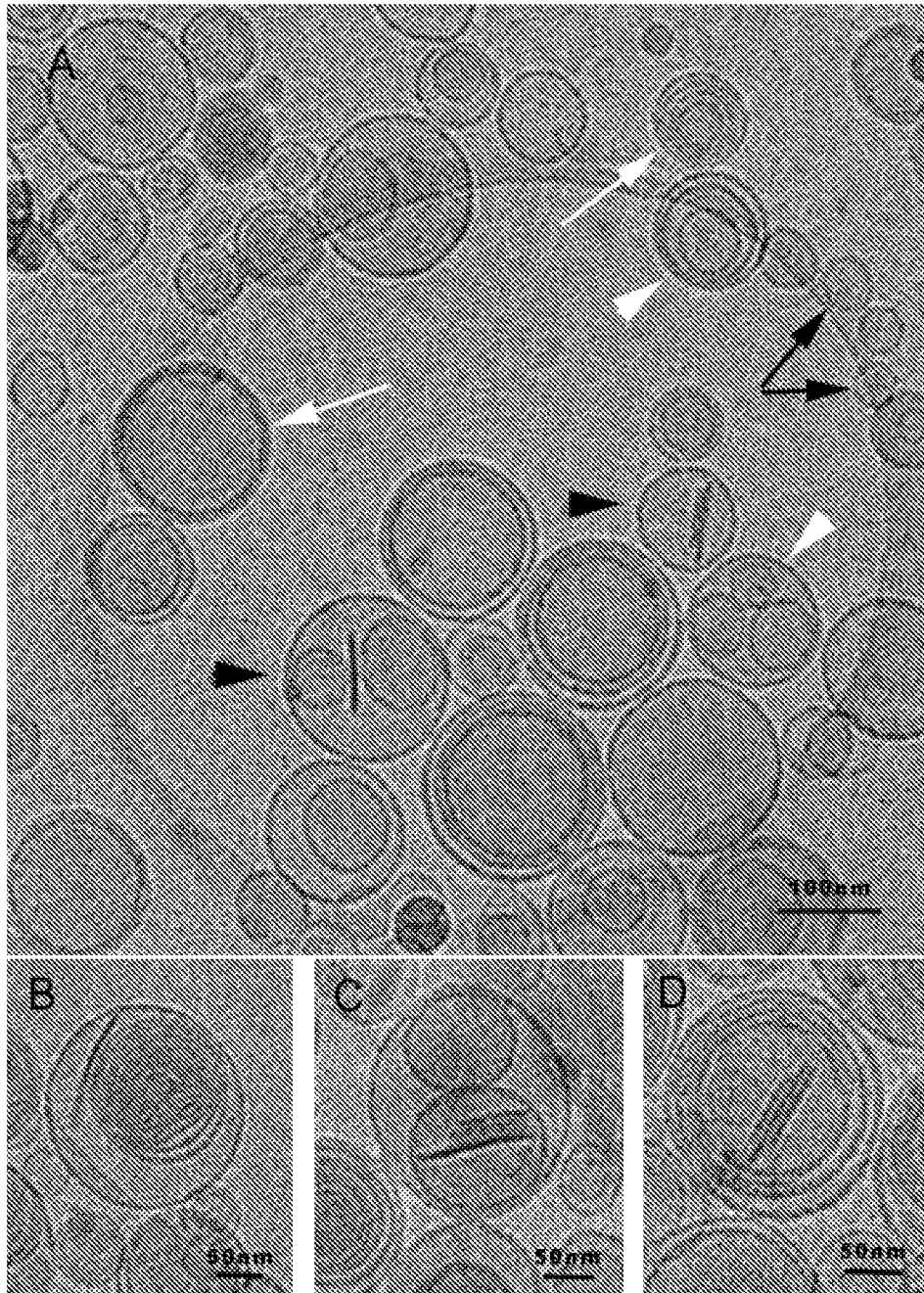


FIG. 4

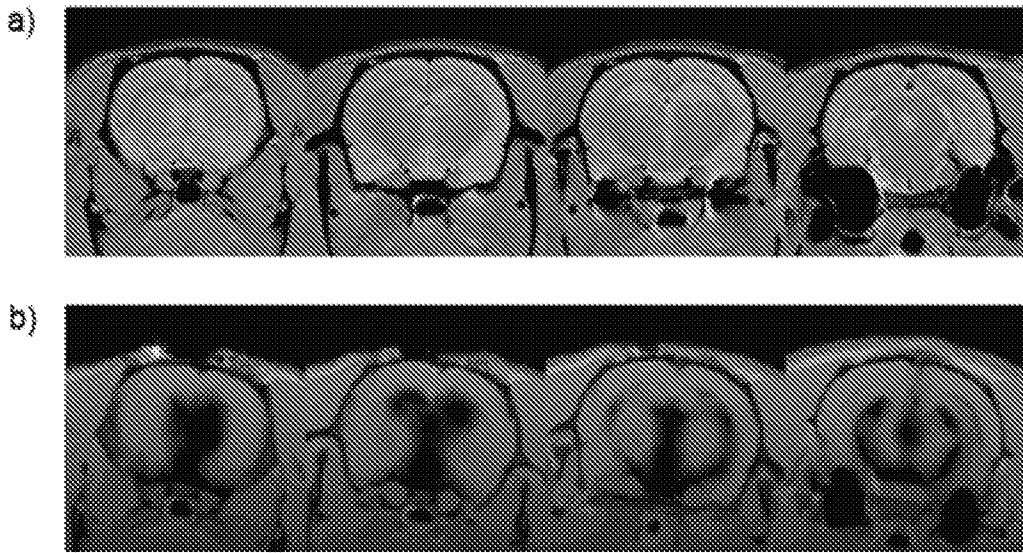


FIG. 5

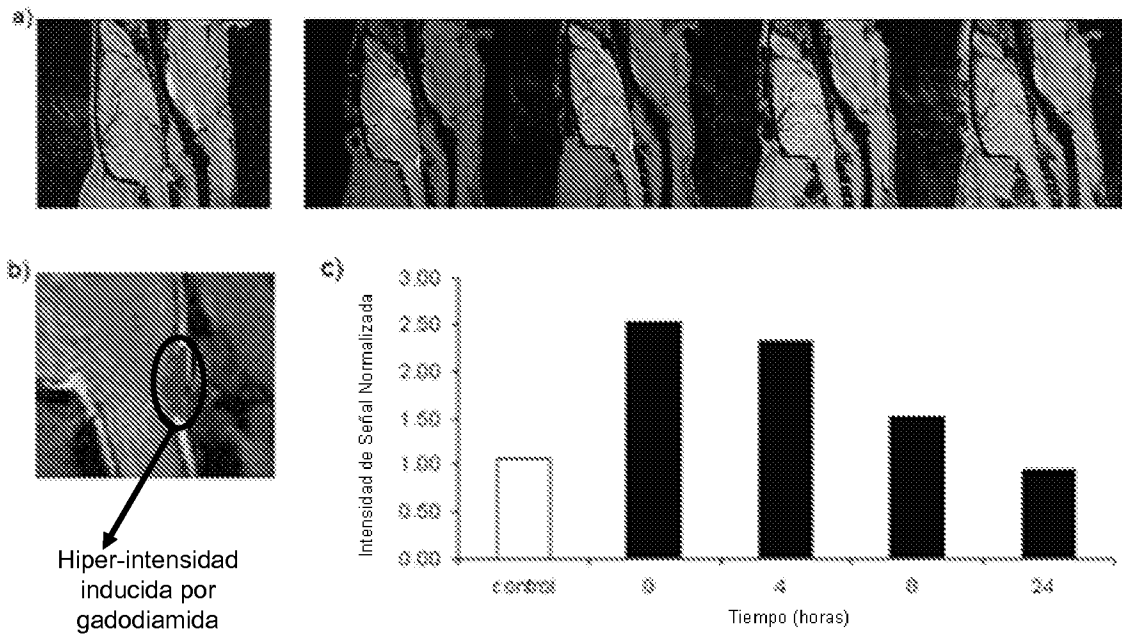


FIG. 6

6/6

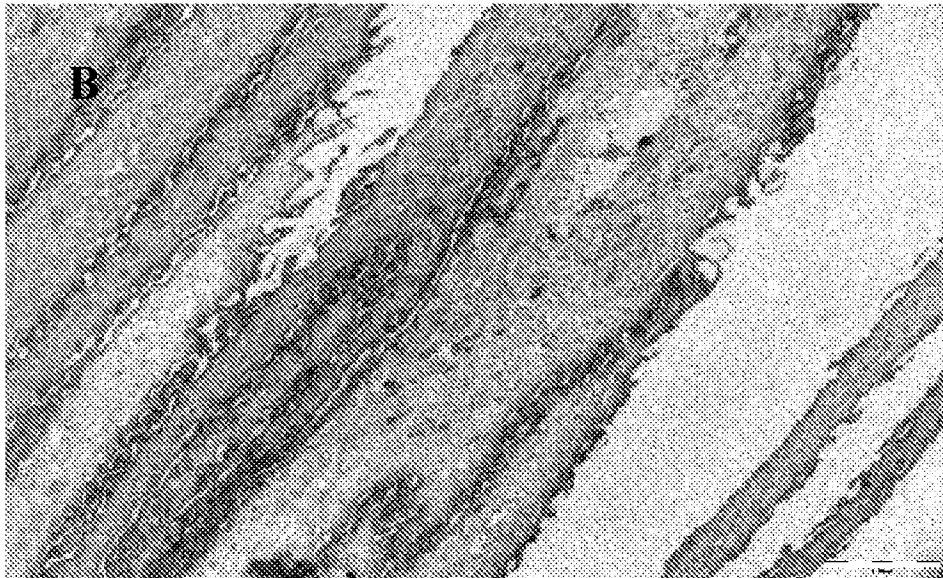
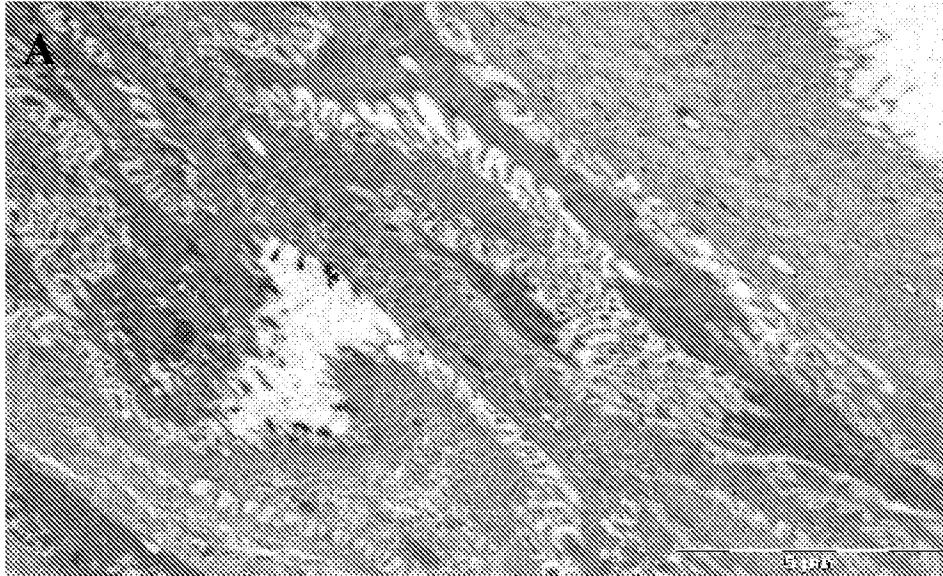


FIG 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/127 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L.BARBOSA-BARROS ET AL "Effect of bicellar systems on skin properties" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 352, 2008, pages 263-272. Abstract, pages 263, 264 and 269.	1-29
A	L.RUBIO ET AL "Bicellar systems for in vitro percutaneous absorption of diclofenac" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 386, 15.02.2010, pages 108-113. Page 109, paragraph 2.2.	1-29
A	JESPER LIND ET AL "Lipid dynamics in fast-tumbling bicelles with varying bilayer thickness. Effect of model transmembrane peptides" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol 1778, 2008, pages 2526-2534. Page 2528, paragraph 3.1 and page 2532, paragraph 4.	1-29

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
24/06/2011

Date of mailing of the international search report
(26/07/2011)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
S. González Peñalba

Telephone No. 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2011/070128

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
A61K9/127 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	L.BARBOSA-BARROS ET AL "Effect of bicellar systems on skin properties" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 352, 2008, páginas 263-272. Resumen, páginas 263, 264 y 269.	1-29
A	L.RUBIO ET AL "Bicellar systems for in vitro percutaneous absorption of diclofenac" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 386, 15.02.2010, páginas 108-113. Página 109, párrafo 2.2.	1-29
A	JESPER LIND ET AL "Lipid dynamics in fast-tumbling bicelles with varying bilayer thickness. Effect of model transmembrane peptides" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol 1778, 2008, páginas 2526-2534. Página 2528, párrafo 3.1 y página 2532, párrafo 4.	1-29

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
24/06/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
26 de julio de 2011 (26/07/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
S. González Peñalba
N° de teléfono 91 3493025