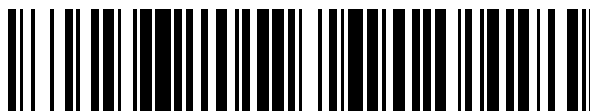


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 681**

51 Int. Cl.:

A23L 1/304 (2006.01)

A23L 1/00 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 31/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011 E 11709950 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2550020**

54 Título: **Sistema micelar inverso que comprende iones metálicos y uso del mismo**

30 Prioridad:

24.03.2010 US 317024 P
24.03.2010 EP 10305298

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2015

73 Titular/es:

MEDESIS PHARMA (100.0%)
L'Orée des Mas Avenue du Golf
34670 Baillargues, FR

72 Inventor/es:

MAUREL, JEAN-CLAUDE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 681 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

Sistema micelar inverso que comprende iones metálicos y uso del mismo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un sistema micelar inverso en base a esteroides, acilglicérols y fosfolípidos o esfingolípidos e iones metálicos. El sistema micelar inverso de la invención puede atravesar la mucosa y las membranas celulares. De este modo, permite la vectorización de iones metálicos en sitios diana. Es ventajosamente útil en los campos farmacéutico y dietético.

Antecedentes de la invención

Durante los últimos años, se han propuesto diversos enfoques para mejorar la administración de fármacos al sitio diana. En primer lugar, el fármaco se debe administrar mediante una vía adecuada y fácil, tales como las vías oral o rectal, y en segundo lugar el principio activo se debe administrar a las células diana en una forma activa. Actualmente no existe un dispositivo disponible que permita este tipo de transporte vectorizado de moléculas activas.

Muchas publicaciones y patentes describen procedimientos para encapsular principios activos en nano- o micro-partículas, pero el problema, hasta la fecha sin resolver, es proporcionar una vía fácil de administración diferente de la vía inyectable, tales como las vías oral y bucal, y una administración eficiente del producto activo a los sitios diana.

Los inventores han descubierto previamente que agitar dos tipos de lípidos con algunas sales metálicas permitía aumentar la biodisponibilidad de sal y por consiguiente obtener algo de actividad terapéutica con dosis de 1000 a 5000 veces más bajas; se podía reducir entonces la toxicidad potencial de dichas sales (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 6.129.924, y los documentos WO 02/36134 y WO 2004/075990).

Los inventores identificaron en particular nuevos productos indicados con el término "complejos organometálicos", y obtenidos mediante reacción entre un derivado de vanadio en estado de oxidación 4, o 5 y dos compuestos orgánicos aislados de extractos de plantas y constituidos respectivamente por sitosterol y acilglicérols.

Los inventores descubrieron también que se podían preparar complejos similares a partir de otros derivados de metales en los que el metal es conocido, por ejemplo, por su actividad antidiabética.

También descubrieron que se podían obtener complejos similares a partir de derivados orgánicos previamente mencionados y diversos cationes de metales útiles como biocatalizadores en el metabolismo vivo, siendo estos complejos agentes particularmente efectivos como vectores de dichos cationes. La vectorización de este tipo de cationes metálicos permite una importante disminución de la toxicidad de cationes administrados en comparación con su administración en ausencia de micelas como se ha descrito previamente. En realidad, el empleo de complejos de este tipo, como se ha descrito en el documento WO 2006/048773, permite la vectorización eficiente de los cationes en los sitios diana y, de este modo permite la administración de cantidades mucho más bajas de metal. Por ejemplo, el empleo de estos complejos permite obtener la misma actividad terapéutica con dosis de 1000 a 10000 veces más bajas.

Complejos de este tipo han mostrado ser efectivos en vectorizar cationes metálicos en pequeñas cantidades, por ejemplo, inferiores a 80 µg de litio, por ml de formulación. Si cantidades de este tipo son suficientes para comparar la actividad terapéutica de cationes en animales, la transposición en la escala humana requiere que se administren cantidades más altas de cationes. La estabilidad de las microemulsiones que contienen cantidades más altas de metal no es siempre satisfactoria para permitir su desarrollo, por ejemplo, como sistemas de administración de fármacos y/o compuestos dietéticos.

La incorporación de un fosfolípido o un esfingolípidos, en particular en cantidades específicas, en la formulación de microemulsiones que comprenden dosis más altas de iones metálicos provocó sorprendentemente un incremento importante en su estabilidad.

La presente invención describe nuevas formulaciones de microemulsiones capaces de vectorizar cantidades altas de iones metálicos, un proceso de preparación y su uso como sistemas de administración de fármacos y/o compuestos dietéticos. Cantidades "altas" se refiere aquí a cantidades suficientes para obtener una actividad terapéutica en la escala humana, pero siguen siendo muy inferiores a las cantidades de cationes administradas en ausencia de complejos. El sistema micelar inverso de la presente invención por ejemplo, puede permitir la vectorización de hasta 1500 µg de metal por ml de formulación.

Ventajosamente, esta formulación hace que sea posible el control y optimización de la composición que comprende micelas para sus usos en los campos farmacéutico y dietético.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de administración aplicado por vía mucosa para liberar iones metálicos, así como composiciones y procedimientos para preparar el sistema de administración. En el presente documento, se describen sistemas micelares inversos diseñados para alcanzar este objetivo de una manera segura y controlada. Los sistemas micelares inversos son capaces de ser absorbidos a través de la mucosa y vectorizar cationes metálicos en una forma protegida de cualquier tejido del organismo.

Las micelas inversas de la invención comprenden más específicamente al menos un ion metálico, un estero, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol, y agua.

Las micelas inversas se pueden preparar según un procedimiento descrito en lo sucesivo utilizando al menos estero, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol y agua.

Dichas micelas se pueden obtener particularmente mediante el procedimiento siguiente:

(a) poner en contacto (i) estero, preferentemente sitosterol o colesterol, (ii) acilglicerol, preferentemente diacilglicerol, (iii) fosfolípido, preferentemente fosfatidilcolina, o esfingolípido, (iv) alcohol, (v) agua, preferentemente agua purificada, y (vi) al menos un ion metálico;

(b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a) a 40 °C o menos, y durante un tiempo suficiente para obtener la formación de micelas inversas.

Los parámetros de agitación, por ejemplo, duración y velocidad de la agitación mecánica, se pueden determinar fácilmente por cualquiera de los expertos en la técnica y en función de las condiciones experimentales. En la práctica, estos parámetros son tales que se obtiene una microemulsión; la velocidad se determina con el fin de permitir la formación de una formulación visualmente transparente, y la duración de la agitación es tal que la agitación puede detenerse pocos minutos después de obtener la formulación visualmente transparente.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende micelas inversas de la invención y un portador, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción es de las realizaciones preferentes a modo de ejemplos solo y sin limitar la combinación de características necesarias para implementar la invención.

Micelas inversas

El sistema micelar inverso según la invención se caracteriza como una microemulsión que comprende una dispersión de nanogotas de agua en aceite. La dispersión se estabiliza mediante dos tensioactivos (acilglicerol, más preferentemente un diacilglicerol y un fosfolípido, más preferentemente fosfatidilcolina, o un esfingolípido) y un cotensioactivo (alcohol) que probablemente se encuentra en la interfase agua/aceite. La fase micelar inversa se puede definir como un sistema en el que el agua forma la fase interna y las colas hidrófobas de los lípidos forman la fase continua. Las micelas inversas que contienen aceite(s), tensioactivo(s), cotensioactivo(s), y una fase acuosa también se caracterizan como microemulsiones de agua en aceite. Estas microemulsiones son termodinámicamente estables y visualmente transparentes.

Generalmente, el tamaño de las micelas según la invención es muy pequeño, más particularmente, es menor a 10 nm, más específicamente es menor a 8 nm y más preferentemente menor a 6 nm. El tamaño puede variar con la cantidad de agua añadida y fosfolípido o esfingolípido. La presente invención se refiere más particularmente a micelas inversas con un núcleo acuoso de aproximadamente 4 nm, preferentemente de 3 a 5 nm, más preferentemente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm.

Las micelas inversas y el tamaño de su núcleo se pueden caracterizar mediante diversos procedimientos, que incluyen:

- Dispersión de rayos x a ángulo pequeño (SAXS)
- Dispersión de neutrones
- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)
- Dispersión dinámica de luz (DLS)

Las relaciones de los constituyentes lipídicos (incluyendo estero, acilglicerol y fosfolípido o esfingolípido) en el sistema micelar inverso según la invención pueden variar. Por ejemplo, la relación en peso de estero/acilglicerol puede oscilar de 0,015 a 0,05, más particularmente de 0,03 a 0,04. La relación en peso de fosfolípido o esfingolípido/acilglicerol puede oscilar de 0,05 a 0,40, en particular de 0,06 a 0,25. El peso de fosfolípido o

esfingolípidos corresponde respectivamente al peso total de la mezcla de fosfolípidos o esfingolípidos, por ejemplo, el peso de lecitina, que se utiliza en la formulación. De manera similar, el peso de acilglicerol corresponde al peso total de la mezcla que contiene usualmente un acilglicerol, o una mezcla de acilglicerol, con glicerol y ácidos grasos obtenidos a partir de dicho(s) acilglicerol(es).

Los compuestos del sistema micelar inverso se pueden analizar mediante medios apropiados. Más específicamente, se pueden identificar esteroides mediante análisis por cromatografía de gases y acilglicerol por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), en particular con un detector de dispersión de luz, en una columna de sílice, en presencia de un eluyente, por ejemplo, acetonitrilo isocrático. También se puede utilizar cromatografía de gases para analizar diacilglicerol. Se pueden analizar fosfolípidos y esfingolípidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), con una columna diol con un detector de dispersión de luz.

Las micelas inversas son sistemas dinámicos. El movimiento browniano provoca colisiones perpetuas de las micelas, que da lugar a la coalescencia de las micelas y al intercambio de los núcleos acuosos. Se produce la separación y regeneración de micelas y permite las reacciones químicas entre diferentes soluciones. La velocidad de intercambio entre micelas aumenta en particular con la temperatura, la longitud de las cadenas de hidrocarburo del tensioactivo, y la relación agua/tensioactivo. En el contexto de la invención, los núcleos acuosos de las micelas deben tener un tamaño específico que permita a los iones metálicos estabilizarse en las micelas preparadas. Como se ha mencionado previamente, el tamaño del núcleo acuoso es preferentemente aproximadamente de 4 nm, más preferentemente de 3 a 5 nm, más específicamente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm.

Las micelas inversas pueden existir en el sistema de la invención como organizaciones estructurales diferentes, tales como por ejemplo esferas, cilindros o cilindros ramificados.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que la inclusión de un fosfolípido o un esfingolípidos, en particular en cantidades específicas, en el sistema micelar inverso permite la formación de micelas con mayor diámetro y volumen, lo que permite de este modo la vectorización de mayores cantidades de iones metálicos. Este aumento en las cantidades de cationes vectorizados permite la vectorización de cantidades suficientes para obtener una actividad terapéutica en humanos.

El sistema micelar inverso de la invención garantiza la absorción de los compuestos que se van a administrar a través de la mucosa, preferentemente entre la mucosa bucal, nasal y/o rectal, más preferentemente a través de la mucosa bucal. Asimismo, las micelas inversas de la presente invención proporcionan una importante biodisponibilidad con baja variabilidad de absorción.

Procedimiento para preparar micelas inversas

En una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento para preparar micelas inversas que presentan un núcleo acuoso de aproximadamente 4 nm, preferentemente de 3 a 5 nm, más preferentemente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm y que comprende al menos un ion metálico, un esteroide, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípidos, un alcohol, y agua, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

(a) poner en contacto (i) esteroide, (ii) acilglicerol, preferentemente diacilglicerol, (iii) fosfolípido, preferentemente fosfatidilcolina o esfingolípidos, (iv) alcohol, (v) agua, preferentemente agua purificada, y (vi) al menos un ion metálico;

(b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a) a 40 °C o menos, y durante un tiempo suficiente para obtener la formación de micelas inversas.

Las micelas inversas obtenidas y recuperadas son particularmente útiles como sistema de administración de iones metálicos. La etapa (b) del proceso es de particular importancia pues permite obtener micelas inversas, siendo dichas micelas inversas luego útiles como sistema de transporte para administrar iones metálicos a los sitios diana. Los sitios diana, por ejemplo, pueden ser células de un tejido específico.

En una realización particular, el ion metálico se solubiliza en primer lugar en agua (preferentemente en agua purificada) para formar una mezcla acuosa. Dicha mezcla acuosa se introduce a continuación en la mezcla aceitosa (etapa (a)). Dicha mezcla aceitosa comprende preferentemente al menos un esteroide, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípidos y un alcohol.

Los compuestos implicados en la etapa (a) se describirán con más detalle en lo sucesivo.

La agitación de la mezcla obtenida en la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura menor a o igual a 40 °C, que oscila específicamente de 15 °C a 40 °C, o de 25 °C a 40 °C, o más específicamente de 30 °C a 37 °C. El tiempo suficiente puede variar en particular en función de la técnica de agitación empleada. El tiempo de agitación es en cualquier caso el tiempo necesario para convertir la mezcla inicial en una solución micelar inversa visualmente transparente. Un experto en la técnica sabe cómo seleccionar los excipientes o componentes que se pueden utilizar

junto con la composición según la presente invención con el fin de mantener sus propiedades beneficiosas. En particular, la presencia de glicerol, puede cuando se introduce en gran cantidad, prevenir la formación de micelas inversas o romper el sistema micelar inverso. Más específicamente, se utiliza no más del 2,5 % (porcentaje expresado en peso de glicerol/peso de acilglicerol) para la preparación de las micelas inversas de la presente invención.

Se pueden introducir otros compuestos en la etapa (a). Se pueden citar por ejemplo, agentes colorantes y/o sustancias aromatizantes.

De manera ventajosa, los compuestos citados anteriormente o las mezclas disponibles comercialmente que los contienen son los únicos ingredientes introducidos para preparar el sistema micelar y por consiguiente, los únicos presentes en el sistema micelar de la invención.

La agitación de la etapa (b) puede realizarse, por ejemplo, mediante agitación mecánica.

Los materiales comunes pueden ser propulsores cuyos rápidos movimientos generan turbulencias y remolinos que permiten la interpenetración de partículas y la formación de micelas inversas en la mezcla.

La velocidad de agitación mecánica oscila preferentemente de 100 a 2000 r/minuto, más preferentemente de 300 a 700 r/minuto. Los volúmenes, el dispositivo y la velocidad de agitación implementados dependen y se deben adaptar con los reactivos y sus cantidades.

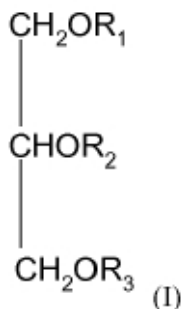
Como se ha descrito previamente, la temperatura de la mezcla no debe exceder los 40 °C para evitar la degradación de los reactivos. La temperatura oscila más específicamente de 15 °C a 40 °C, o de 25 °C a 40 °C, o incluso más específicamente de 30 °C a 37 °C.

COMPUESTOS DE MICELAS INVERSAS

ACILGLICEROL

Los acilgliceroles útiles para la preparación del sistema micelar inverso según la invención se pueden aislar de la mayoría de los animales y más preferentemente de las plantas.

Los acilgliceroles incluyen mono-, di- y triacilgliceroles. En una realización particular, los acilgliceroles utilizados preferentemente en la presente invención presentan la siguiente fórmula (I):



en la que:

- R₁ es un resto de acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, un átomo de hidrógeno, o una mono-, di- o tri-galactosa o glucosa;
- R₂ es un resto de acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 2 y 18 átomos de carbono;
- R₃ es un resto de acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, o un átomo de hidrógeno.

Según una realización particular, R₁ o R₃, preferentemente solo uno de R₁ y R₃, en particular solo R₁, representa un resto de acilo de ácido oleico (C18:1[cis]-9).

Según un aspecto particular, R₂ tiene un enlace insaturado (por ejemplo, enlace etilénico) y tiene ventajosamente 18 átomos de carbono, preferentemente R₂ es un resto de ácido oleico (grupo oleoilo), uno de sus isómeros posicionales con respecto al doble enlace (cis-6, 7, 9, 11, y 13) o uno de sus isómeros ramificados en iso.

Según otro aspecto particular, R₁ representa un grupo oleoil.

Según otro aspecto particular, R₂ representa un grupo acetilo.

5 Según otro aspecto particular, R₃ es un átomo de hidrógeno.

Como norma general, se elegirá un aceite que contenga una concentración elevada de ácido oleico como fuente útil de acilglicerol según la invención. Un aceite de este tipo contiene usualmente una proporción elevada de acilglicerol útiles según la invención.

10 Según un aspecto particular de la invención, los diglicerol de ácidos grasos preferentes se seleccionan entre el grupo que consiste en 1,2-dioleoilglicerol (o llamado también en el presente documento 1,2-dioleína) y 1-oleoil-2-acetil glicerol.

15 Un número determinado de ellos, y más particularmente aquellos que se han descubierto que son los más activos en las aplicaciones buscadas, también están disponibles comercialmente. Este es el caso en particular de 1-oleoil-2-acetilglicerol y 1,2-dioleoilglicerol. El monoleato de glicerol 40 contiene aproximadamente el 33 % de dioleoil glicerol, y aproximadamente 11 % de 1,2-dioleína y está aceptado farmacéuticamente (*Farmacopea Europea* (4ª edición), *USP 25/NF20*, y *Estándar japonés para los aditivos alimentarios*). Este producto está disponible comercialmente, por ejemplo en Gattefossé Company con el nombre PECEOL®.

20 Los acilglicerol se incorporan o comprenden preferentemente en la composición o sistema micelar inverso en una cantidad en peso que oscila de 50 g a 90 g con respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema micelar inverso según la invención. Las cantidades especificadas en el presente documento se adaptarán con respecto a los otros compuestos que se corresponden más específicamente a las relaciones en peso identificadas en lo sucesivo.

ESTEROLES

30 Los esterol útiles para la preparación del sistema micelar inverso según la invención son preferentemente esterol naturales, tales como colesterol o fitosterol (esterol vegetales). Sitosterol y colesterol son los esterol preferentes útiles para el sistema micelar inverso según la invención.

35 Sitosterol y colesterol están disponibles comercialmente. Más particularmente, se puede utilizar sitosterol comercial que se extrae de la soja. En un producto de este tipo, el sitosterol representa generalmente del 50 al 80 % en peso del producto y generalmente se encuentra en una mezcla con campesterol y sitostanol en proporciones respectivas del orden del 15 % cada uno. Se puede utilizar también sitosterol comercial, denominado talloil, que se extrae de una variedad de pino. En general, será posible emplear sitosterol en una mezcla con sitostanol. Preferentemente, dicha mezcla comprende al menos 50 % de sitosterol en peso de la mezcla.

40 Como se ha mencionado previamente, las relaciones de los constituyentes lipídicos (esterol, acilglicerol y fosfolípidos o esfingolípidos) en el sistema micelar inverso según la invención pueden variar. Preferentemente, la relación en peso esterol/acilglicerol puede oscilar de 0,015 a 0,05, más particularmente de 0,03 a 0,04. El peso de esterol corresponde en la presente invención al peso total de esterol utilizados en la formulación, por ejemplo, el peso de fitosterol.

45 Los esterol se incorporan o comprenden preferentemente en la composición o sistema micelar inverso en una cantidad en peso que oscila de 0,825 g a 4,5 g con respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema micelar inverso según la invención. Las cantidades especificadas en el presente documento se adaptarán con respecto a los otros compuestos que se corresponden más específicamente a las relaciones en peso identificadas previamente y/o en lo sucesivo.

FOSFOLÍPIDOS Y ESFINGOLÍPIDOS

55 Los fosfolípidos están formados por un glicerol unido a 2 ácidos grasos y a un grupo fosfato. La variabilidad de los fosfolípidos depende de los ácidos grasos que se unen al glicerol y en los grupos químicos que son susceptibles de unirse al grupo fosfato. Los fosfolípidos son, junto con los esfingolípidos, los principales constituyentes lipídicos de las membranas biológicas.

60 Entre los fosfolípidos útiles en la presente invención, se puede citar fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, y fosfatidilcolina.

En una realización particular, el fosfolípido es fosfatidilcolina. La fosfatidilcolina es conocida también como 1,2-diacylglicerol-3-fosfocolina o PtdCho.

65 La fosfatidilcolina se forma a partir de una colina, un grupo fosfato, un glicerol y dos ácidos grasos. En realidad es un grupo de moléculas, en el que las composiciones de ácido graso varían de una molécula a otra. La fosfatidilcolina se

puede obtener a partir de lecitina comercial que contiene fosfatidilcolina en concentraciones en peso del 20 al 98 %. La lecitina preferentemente utilizada para preparar micelas inversas según la invención es Epikuron 200® y contiene fosfatidilcolina en una concentración de más del 90 %.

5 Los esfingolípidos son una clase de lípidos obtenidos a partir de aminoalcohol alifático esfingosina. Entre los esfingolípidos que se pueden emplear en la presente invención se pueden citar acilesfingosina, esfingomielinas, glicosfingolípidos, y gangliósidos.

10 El sistema de micelas inversas de la invención puede comprender fosfolípidos, esfingolípidos, o una mezcla de ambos tipos de compuestos.

Según una realización específica, el sistema de micelas inversas de la invención comprende fosfolípidos.

15 La relación en peso de fosfolípido y/o esfingolípidos/acilglicerol en las composiciones o sistemas micelares inversos según la invención es de 0,05 a 0,40, preferentemente de 0,06 a 0,25.

20 Los fosfolípidos o esfingolípidos se incorporan o comprenden preferentemente en la composición o sistema micelar inverso en una cantidad en peso que oscila de 1 g a 30 g, preferentemente de 5 a 20 g con respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema micelar inverso según la invención. Las cantidades especificadas en el presente documento se adaptarán con respecto a los otros compuestos que se corresponden más específicamente a las relaciones en peso identificadas previamente.

ALCOHOLES

25 Alcoholes útiles para preparar el sistema micelar inverso según la invención son preferentemente mono-alcoholes lineales o ramificados de C2 a C6. Ejemplos de alcoholes son etanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol y cualquier mezcla de los mismos. En una realización particular de la invención, alcohol es etanol.

30 El alcohol se incorpora o comprende preferentemente en la composición o sistemas micelares inversos en una cantidad en peso que oscila de 5 g a 12 g con respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema micelar inverso según la invención.

AGUA

35 El agua útil para preparar el sistema micelar inverso según la invención es preferentemente agua purificada.

40 El agua se incorpora o comprende preferentemente en la composición o sistemas micelares inversos en una cantidad en peso que oscila de 1 g a 15 g, preferentemente de 5 g a 15 g, con respecto a 100 ml del volumen total de la composición o sistema micelar inverso según la invención.

45 Un experto en la técnica adaptará la cantidad de fosfolípido o esfingolípidos en los sistemas a la cantidad deseada de agua. Por ejemplo, al aumentar la cantidad de agua se debe implicar el aumento de la cantidad de fosfolípido o esfingolípidos en los sistemas.

METAL

50 Los cationes metálicos que se pueden utilizar para preparar un sistema micelar inverso según la invención son cualquier catión en un estado de oxidación de al menos 1, y cuya actividad biocatalítica es conocida o está por descubrir.

En el contexto de la presente invención, el término "biocatalizador" indicará que estos metales ejercen una actividad catalítica en los sistemas biológicos.

55 Los iones metálicos desempeñan un papel esencial en aproximadamente un tercio de las enzimas (*Metal Ions in Biological Systems*, Jenny P. Glusker, Amy K. Katz and Charles W. bock, The Rigaku Journal, vol 16, Nº 2, 1999). Estos pueden tener diferentes tipos de acciones:

- 60 - modificación de flujos de electrones del sustrato o la enzima, permitiendo el control de una reacción catalítica enzimática;
- conexión con los componentes proteínicos de la enzima para proporcionar una configuración espacial que permite presentar sus sitios activos;
- 65 - permitir una actividad de oxidación-reducción cuando el metal tiene varias valencias.

El metal se seleccionará según la actividad biológica deseada.

Como ejemplos, si se busca un producto con actividad hipolipidémica, o actividad hipoglucémica y/o antidiabética y/o insulinoimimética, se puede elegir más particularmente un derivado metálico de vanadio, niobio, molibdeno, selenio, cromo, zinc o titanio.

Como ejemplos, si se busca un producto con actividad neuroprotectora, se puede elegir más particularmente un derivado metálico de litio.

Como ejemplos, si se busca un producto con actividad en estrés oxidativo, se puede elegir más particularmente un derivado metálico de manganeso.

Como ejemplos, si se busca un producto con actividad en osteoporosis, se puede elegir más particularmente un derivado metálico de estroncio.

Como ejemplos, si se busca un producto con actividad en cánceres, en particular leucemia promielocítica aguda, se puede elegir más particularmente un derivado metálico de arsénico.

En estos derivados metálicos:

- litio está preferentemente en un estado de oxidación igual a 1;
- vanadio está ventajosamente en un estado de oxidación igual a 3, 4 o 5, preferentemente 4;
- manganeso está en general en un estado de oxidación comprendido entre y 1 y 7, preferentemente 2, 3, 4, 6 o 7;
- selenio está ventajosamente en un estado de oxidación igual a 4 o 6, preferentemente 4;
- molibdeno está en general en un estado de oxidación comprendido entre 3 y 6, preferentemente 3;
- cromo está preferentemente en un estado de oxidación igual a 3;
- niobio está ventajosamente en un estado de oxidación igual a 4 o 5, preferentemente 5;
- arsénico está preferentemente en un estado de oxidación igual a 3;
- zinc está preferentemente en un estado de oxidación igual a 2, 3 o 4;

En una realización particular, el ion metálico presenta un estado de oxidación de al menos 1.

A continuación se indican ejemplos de metales adaptados a otros tipos de actividad:

- litio en patologías del sistema nervioso central, tales como trastorno bipolar, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, prevención de la demencia, o enfermedad causada por una infección por priones;
- antimonio o estaño, si se desea un tratamiento que concierne a enfermedades autoinmunitarias, en particular, sistema nervioso, por ejemplo, esclerosis múltiple y cancerología;
- oro, en enfermedades autoinmunitarias que afectan al sistema locomotor, por ejemplo, en artritis reumatoide;
- vanadio en diabetes tipo 2, resistencia a la insulina y síndrome metabólico;
- rutenio o paladio en tumores respiratorios o neoplasias;
- estaño en síndromes de inmunodeficiencia adquirida;
- selenio en cancerología;
- estroncio en osteoporosis.
- arsénico en cánceres, en particular leucemia promielocítica aguda;
- manganeso en enfermedad asociada al estrés oxidativo.

En una realización particular, el catión metálico se selecciona entre el grupo que consiste en litio, zinc, niobio, vanadio, selenio, molibdeno, cromo, antimonio, estaño, oro, rutenio, paladio, platino, estroncio, arsénico y manganeso.

5 Los iones metálicos se pueden introducir en las micelas inversas de la invención como sales metálicas.

A modo de ejemplos, derivados metálicos particularmente útiles según la invención se seleccionan entre sulfatos, hidratos, haluros, en particular cloruros, citratos, carbonatos y cualquier otra sal soluble en agua.

10 En algunos casos será posible utilizar sales de amonio, metóxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos que se pueden disolver en agua o en ocasiones en alcoholes. Sin embargo, se preferirán las sales solubles en agua.

Cualquier metal con una sal soluble en agua se puede introducir en las micelas inversas según la invención. La elección del metal variará en función de la actividad terapéutica deseada.

15 Cualquier experto en la técnica es consciente de las dificultades inherentes del uso terapéutico de cationes metálicos debido a la toxicidad de dichos cationes metálicos en una cantidad activa efectiva: ejemplos bien conocidos son las sales de litio empleadas en trastornos psiquiátricos o neurológicos o las sales de platino, rutenio o paladio empleadas en cancerología. La inclusión de cationes de este tipo en los sistemas micelares inversos de la invención permite la utilización de cationes en bajas cantidades.

Como se ha indicado previamente, un metal preferente es un metal que exhibe una actividad biocatalítica.

25 Puesto que se pueden administrar iones metálicos según la invención de manera eficiente al (los) sitio(s) diana, la actividad terapéutica se obtiene con cantidades de metal divididas por 100 a 1000 en comparación con la actividad obtenida con una sal o un derivado orgánico del mismo metal cuando no se incluye en el sistema micelar inverso de la invención.

30 La concentración en peso de los cationes en la microemulsión se calcula más específicamente con una densidad de $0,94 \pm 0,03$ para la microemulsión.

La densidad se mide generalmente en temperatura ambiente y presión atmosférica.

SISTEMA MICELAR INVERSO Y SU USO

35 Las micelas inversas de la invención permiten que los iones metálicos incluidos en las mismas se administren y transporten a los sitios diana, en particular células.

40 Hoy día se sabe que se puede utilizar un sistema micelar inverso para preparar nanomateriales, que actúan como microrreactores. Se puede controlar la actividad y estabilidad de las biomoléculas, principalmente mediante la concentración de agua en el sistema micelar inverso.

Un objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende micelas inversas tal y como se ha definido previamente y al menos un portador, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

45 Según una realización específica, la composición farmacéutica según la invención comprende de 5 a 20 g de fosfolípido o esfingolípido con respecto a 100 g de composición, y de 5 a 15 g de agua con respecto a 100 ml de composición.

50 En una realización específica, la composición farmacéutica de la invención se utiliza para la administración, más específicamente, la administración a través de la mucosa, de iones metálicos.

Según realizaciones particulares, la composición farmacéutica se encuentra en forma de cápsula, comprimido, aerosol, pulverizador, solución o una cápsula de gelatina blanda elástica. Un objeto adicional de la invención se refiere al empleo de micelas inversas como se ha definido previamente para preparar una composición farmacéutica destinada a la administración, más específicamente, la administración a través de la mucosa, de iones metálicos.

60 Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la administración de al menos un ion metálico a un mamífero (en particular, un humano), dicho procedimiento comprende la administración de la composición de micelas inversas al mamífero como se ha definido previamente. En una realización específica, la presente invención proporciona un procedimiento para la administración a través de la mucosa de al menos un ion metálico, dicho procedimiento comprende la administración a través de la mucosa a dicho mamífero (en particular, un humano) de una composición de micelas inversas como se ha definido previamente.

65 La presente invención proporciona un procedimiento para la prevención, el tratamiento, o la mejora de enfermedades crónicas. En una realización específica, la presente invención proporciona un procedimiento para la

prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados a un enfermedad o trastorno en relación con la actividad catalítica del ion metálico empleado, dicho procedimiento comprende la administración a través de la mucosa a un sujeto que lo necesita de una cantidad efectiva de una composición de micelas inversas como se ha definido previamente y que comprende al menos un ion metálico útil en la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad o trastorno.

Como excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, se puede utilizar cualquier excipiente, vehículo o portador bien conocido por el experto en la técnica. Se pueden utilizar otros aditivos bien conocidos por los expertos en la técnica tales como estabilizadores, desecantes, aglutinantes o tampones de pH. Excipientes preferentes según la invención favorecen la adherencia del producto acabado a la mucosa.

La presente invención se refiere además al empleo de una composición farmacéutica como se ha descrito previamente para la administración de al menos un ion metálico a un mamífero, dicha administración comprende la administración mucosa de la composición farmacéutica.

Las composiciones de la invención se pueden administrar de diferentes maneras, en particular, a través de la absorción del tejido de la mucosa, con absorción bucal, nasal, vaginal o digestiva.

Las composiciones farmacéuticas tal y como se han descrito previamente se pueden utilizar en particular para la prevención, el tratamiento o la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno seleccionado entre patologías del sistema nervioso central (SNC), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, cánceres, tales como tumores respiratorios o leucemia promielocítica aguda, síndromes de inmunodeficiencia adquirida, cancerología, osteoporosis, enfermedades asociadas al estrés oxidativo, trastornos bipolares, depresión y trastornos inflamatorios.

Los iones metálicos en el sistema micelar inverso formulado según la invención son preferentemente capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Por consiguiente, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (SNC), en particular, enfermedades genéticas, tumorales, virales y/o degenerativas en el SNC.

Una realización particular se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha descrito previamente, en la que el ion metálico es litio, y que se utiliza para la prevención, el tratamiento o la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno seleccionado entre patologías del SNC y enfermedades neurodegenerativas.

Una realización particular adicional se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha descrito previamente, en la que el ion metálico es vanadio, y que se utiliza para la prevención, el tratamiento o la mejora de síntomas de una enfermedad o trastorno seleccionado entre diabetes tipo 2, resistencia a la insulina y síndrome metabólico.

Una realización particular adicional se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha descrito previamente, en la que el ion metálico es manganeso, y que se utiliza para la prevención, el tratamiento o la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno seleccionado entre trastornos asociados al estrés oxidativo.

Una realización particular adicional se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha descrito previamente, en la que el ion metálico es arsénico, y que se utiliza para la prevención, el tratamiento o la mejora de los síntomas de cánceres, tales como leucemia promielocítica aguda.

Una realización particular adicional se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha descrito previamente, en la que el ion metálico es estroncio, y que se utiliza para la prevención, el tratamiento o la mejora de los síntomas de la osteoporosis.

"Sujeto" se refiere a un organismo en el que se puede administrar iones metálicos de la invención. El sujeto puede ser un animal no humano, preferentemente un mamífero. El sujeto preferente es un sujeto humano.

Tal como se ha utilizado en el presente documento, el término "mucosa" y "a través de la mucosa" se refiere a un tejido mucoso tal como tejido respiratorio, digestivo o genital. "Administración por vía mucosa", "administración a través de la mucosa" y términos análogos según se utilizan en el presente documento, se refieren a la administración de una composición a través del tejido mucoso. "Administración por vía mucosa", "administración a través de la mucosa" y términos análogos incluyen, pero no se limitan a, la administración de una composición a través del tejido mucoso bronquial, gingival, lingual, nasal, oral, vaginal, rectal, y gastrointestinal.

En una realización preferente de la invención, la composición de micelas inversas de la invención se administra por vía mucosa como una cápsula, comprimido, aerosol, pulverizador, solución o cápsula de gelatina blanda elástica. Las composiciones de la invención se pueden introducir, por ejemplo, en forma líquida en cápsulas que liberan su contenido en la boca o en cualquier tejido mucoso. Preferentemente, las composiciones de micelas inversas de la invención se administran a un mamífero, más preferentemente a un humano, para tratar una enfermedad o

trastorno.

Los siguientes ejemplos pretenden ejemplificar la operación de la presente invención, pero no limitar su alcance.

5 Descripción de las figuras

- Figura 1: Evaluación del impacto de la tasa de agua incorporada en ausencia de lecitina en las curvas de difracción (Fig. 1a) y tamaño de micelas inversas (Fig. 1b).
- Figura 2: Evaluación del impacto de la tasa de agua incorporada en presencia de lecitina en las curvas de difracción (Fig. 2a) y tamaño de micelas inversas (Fig. 2b).
- Figura 3: Evaluación del impacto del origen de esteroles en las curvas de difracción de las micelas inversas.
- Figura 4: Evaluación *in vivo* de la distribución de litio en componentes sanguíneos después de la administración de litio en micelas inversas formuladas con o sin lecitina.
- Figura 5: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas en puntuaciones clínicas de EAE.
- Figura 6: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas en la pérdida axonal de EAE.
- Figura 7: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas en la coordinación motora de R6/2 (prueba de varilla giratoria (Rotarod)).
- Figura 8: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas en rendimientos motores de R6/2 (prueba de natación en tanque).
- Figura 9: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas en rendimientos cognitivos de R6/2 (prueba de natación en tanque).
- Figura 10: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas sobre la supervivencia de ratones inoculados con priones.
- Figura 11: Evaluación *in vivo* de la eficacia de litio en micelas inversas en el modelo conductual en ratones de depresión (prueba de suspensión por la cola).

Ejemplos

30 Ejemplo 1: Evaluación del impacto de incorporación de agua sobre la formación y tamaño de micelas inversas en ausencia de lecitina

El objetivo de este estudio fue evaluar mediante el procedimiento de difracción de rayos x y la determinación visual, el impacto del contenido de agua en la formación de microemulsiones estables termodinámicamente y el tamaño de micelas inversas dispersadas en las mismas.

Se prepararon según el procedimiento siguiente 10 formulaciones de micelas inversas con diferentes porcentajes de agua.

Se disolvieron 0,7 g de fitosterol en 1,4 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a 37 °C. Se añadió a ello monoleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadió agua purificada a esta mezcla aceitosa y se agitó entre 700 rpm durante 30 minutos a 37 °C para formar micelas inversas "vacías".

Las diferentes formulaciones se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	Contenido de agua (%)	Monoleato de glicerol	Agua
1	1	25,8 g	0,3 g
2	2	25,5 g	0,6 g
3	3	25,2 g	0,9 g
4	4	24,9 g	1,2 g
5	5	24,6 g	1,5 g
6	6	24,3 g	1,8 g
7	7	24,0 g	2,1 g
8	8	23,7 g	2,4 g
9	9	23,4 g	2,7 g
10	10	23,1 g	3,0 g

Se prepararon micelas inversas "vacías" al aumentar la cantidad de agua del 1% al 10 % con un aumento del 1 % (el porcentaje de agua se expresa en peso de agua/volumen total de la composición, densidad de 0,94). El porcentaje de etanol absoluto (5 %) y fitosterol (2,5 %) (peso/peso total de la composición) se mantuvo sin cambios para todos estos productos.

Se evaluó la formación de microemulsiones estables termodinámicamente mediante la determinación visual de su limpidez.

Los parámetros de red se obtuvieron mediante difracción de rayos x y se considera que corresponden al tamaño de las micelas inversas de la invención. Se introdujeron muestras en capilares de vidrio de 1,5 mm de diámetro y se utilizó una configuración de transmisión. Se empleó una fuente de rayos x de ánodo rotatorio de cobre (funciona a 4 kW) con un monocromador multicapa "Osmic" que produce un flujo elevado (10^8 fotones/seg) y un colimador puntual. Se utilizó un detector 2D "placa para imagen". Se obtuvieron curvas de difracción que producen intensidad difractada como una función del vector de onda q . La intensidad difractada se corrigió mediante el tiempo de exposición, la transmisión y la intensidad de fondo a partir de la difusión mediante un capilar vacío. Los tamaños de las micelas inversas se calcularon con la fórmula: $d = 2\pi/q_{\text{máx}}$ ($q_{\text{máx}}$ es el vector de onda correspondiente a la intensidad difractada máxima).

La curva de difracción de 10 muestras preparadas según el procedimiento previo se muestra en la Figura 1a, que demuestra con claridad que entre el 1 % y el 6 % del agua incorporada, el valor q_{max} disminuye cuando el porcentaje de agua aumenta. La Figura 1b muestra que entre el 1 % y el 6 % de agua incorporada, el tamaño de las micelas inversas aumenta de 3,1 a 3,7 nm cuando el porcentaje de agua aumenta. Por el contrario, a partir del 7 % de agua incorporada, el tamaño de las micelas inversas deja de aumentar.

Además, el análisis visual muestra que a partir del 1 al 5 % de agua incorporada, los productos son límpidos. A partir del 6 % de agua, los productos son cada vez más turbios.

Estos resultados muestran con claridad que las formulaciones formadas en ausencia de lecitina son inestables en una cierta cantidad de agua (6 %). Muestran adicionalmente que las micelas formuladas sin lecitina no pueden exceder un tamaño dado incluso cuando se aumente la cantidad de agua en la formulación.

Ejemplo 2: Evaluación del impacto de la incorporación de agua en la formación y tamaño de las micelas inversas en presencia de lecitina

El objetivo de este estudio fue evaluar mediante el procedimiento de difracción de rayos x y la determinación visual, el impacto del contenido de agua en la formación de microemulsiones estables termodinámicamente y el tamaño de micelas inversas dispersadas en las mismas en presencia del aumento de la tasa de lecitina.

Se prepararon según el siguiente procedimiento 3 formulaciones de micelas inversas con diferentes porcentajes de agua y lecitina.

La lecitina disponible comercialmente se disolvió en 8,5 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2,3 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadió a esta monoleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C para formar una mezcla aceitosa. Se añadió agua purificada a la mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente mediante agitación magnética a 700 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Las diferentes formulaciones se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	Lecitina	Monoleato de glicerol	Agua	Mezcla aceitosa
11	0 g (0 %)	79,3 g	20,4 mg (4 %)	453,9 mg
12	9,4 g (10 %)	64,8 g	45,0 mg (9 %)	433,8 mg
13	14,1 g (15 %)	57,0 g	60,0 mg (12 %)	423,3 mg

Se prepararon micelas inversas "vacías" al variar la cantidad de agua del 4 % (muestra 11) al 12 % (muestra 13) y lecitina del 0 % (muestra 11) al 15 % (muestra 13). El contenido de lecitina se calcula a partir del peso de lecitina/peso total de la composición y el contenido de agua a partir del peso de agua/volumen total de la composición (densidad de 0,94). El porcentaje de fitosterol fue del 2,5 % (peso de fitosterol/peso total de la composición) y de etanol absoluto fue del 9 % (peso de etanol absoluto/peso total de la composición) para todas estas muestras.

La formación de microemulsiones estables termodinámicamente se evaluó mediante la determinación visual de su limpidez.

El tamaño de las micelas inversas de estas formulaciones se evaluó mediante experimentos de difracción de rayos x tal como se describe en el Ejemplo 1.

Las curvas de difracción de las muestras 11, 12 y 13 se muestran en la Figura 2a, que demuestra con claridad que la intensidad difractada aumenta y el valor q_{max} disminuye cuando el porcentaje de lecitina aumenta de 0 a 15 %. La Figura 2b demuestra que el tamaño de las micelas inversas aumenta de 3,1 a 4,5 nm cuando el porcentaje de lecitina aumenta de 0 a 15 %. El análisis visual muestra que estas formulaciones son transparentes.

Por consiguiente, estos experimentos muestran que la adición del 15 % de lecitina permite la formación de microemulsiones estables termodinámicamente con un tamaño de micela inversa de 4,5 nm y porcentajes elevados de agua (12 %). La adición de lecitina resuelve, de este modo, los inconvenientes de las micelas inversas formuladas en ausencia de lecitina descritos en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Micelas inversas según la invención

El objetivo de este estudio fue evaluar mediante el procedimiento de difracción de rayos x y la determinación visual, la estabilidad de una microemulsión según la invención y el tamaño de micelas inversas dispersadas en la misma.

Muestra A: Se disolvieron 5,7 g de lecitina disponible comercialmente en 8,5 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2,4 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 68,6 g de monoleato de glicerol y se llevó a acabo agitación magnética a 500 r/min durante 1 hora a 37 °C. Se añadieron 9,0 g de agua purificada que contiene 148,7 mg de sulfato de vanadio (30,0 mg de vanadio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 300 µg de vanadio metálico/ml (densidad de 0,94). La formulación contiene 6 % de lecitina.

El contenido de lecitina se calculó a partir del peso de lecitina/peso total de la composición. El porcentaje de agua fue del 9 % (peso de agua/volumen total de la composición), de fitosterol fue de 2,5 % (peso de fitosterol/peso total de la composición) y de etanol absoluto fue de 9 % (peso de etanol absoluto/peso total de la composición).

El análisis visual mostró que la microemulsión formulada con un 6 % de lecitina fue transparente. El tamaño de las micelas inversas de esta formulación se determinó mediante experimentos de difracción de rayos x como se describe en el Ejemplo 1 para tener 4 nm.

Ejemplo 4: Evaluación del impacto del origen de esterol en la formación y tamaño de micelas inversas

El objetivo de este estudio fue evaluar mediante el procedimiento de difracción de rayos x y la determinación visual, el impacto del origen del esterol (colesterol o fitosterol) incorporado en la formulación sobre la formación de microemulsiones estables termodinámicamente y el tamaño de las micelas inversas dispersadas en las mismas.

Según los siguientes procedimientos se prepararon 4 formulaciones de micelas inversas que contienen vanadio o "vacías" con fitosterol o colesterol:

Muestra B: Se disolvieron 84,5 g de lecitina en 141,0 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 150 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 35,2 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 1074,3 g de monoleato de glicerol y se llevó a acabo agitación magnética a 200 r/min durante 1 hora y 20 minutos a 37 °C. Se añadieron 75,0 g de agua purificada que contiene 1,3 g de sulfato de vanadio (0,27 g de vanadio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 240 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 180 µg de vanadio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra 14: Se añadieron 75,0 g de agua purificada a la mezcla aceitosa preparada según la muestra B y se agitó a temperatura ambiente a 240 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Muestra C: Se disolvieron 1,7 g de lecitina en 2,8 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,7 g de colesterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 21,5 g de monoleato de glicerol y se llevó a acabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 0,5 g de agua purificada que contiene 8,5 mg de sulfato de vanadio (1,8 mg de vanadio metálico) a 8,9 g de esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 180 µg de vanadio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra 15: Se añadieron 0,5 g de agua purificada a 8,9 g de la mezcla aceitosa preparada según la muestra C y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Las micelas inversas que contienen 180 µg de vanadio metálico/ml (muestras B y C) o sin metal (muestras 14 y 15) se formularon con fitosterol o colesterol según los procedimientos previos. El porcentaje de agua fue del 5 % (peso de agua/volumen total de la composición), el de esterol fue de 2,5 % (peso de esterol/peso total de la composición), el de lecitina fue del 6 % (peso de lecitina/peso total de la composición) y el de etanol absoluto fue del 10 % (peso de etanol absoluto/peso total de la composición) para todas estas muestras.

La formación de microemulsiones estables termodinámicamente se evaluó mediante la determinación visual de su limpidez.

El tamaño de las micelas inversas de estas formulaciones se evaluó mediante experimentos de difracción de rayos x como se describe en el Ejemplo 1.

La curva de difracción de las muestras B, C, 14 y 15 se muestra en la Figura 3, que demuestra que los valores q_{max} son iguales para todas las formulaciones. Así pues, la micela inversa se calcula en 3,3 nm. Además, la observación visual de estos productos muestra que todas las muestras son transparentes.

Estos experimentos muestran que ni el origen del esteroles (fitosterol o colesterol) ni la adición de vanadio a 180 µg/ml tiene un impacto en la formación de microemulsiones estables termodinámicamente, ni en el tamaño de micelas inversas dispersadas en las mismas.

Ejemplo 5: Evaluación del reparto sanguíneo *in vivo* de litio formulado en micelas inversas en presencia y ausencia de lecitina

El objetivo de este estudio fue evaluar el reparto en componentes sanguíneos (plasma frente a células sanguíneas) de litio formulado en 2 formulaciones de micelas inversas diferentes preparadas según los siguientes procedimientos (muestras D y E) cuando se administran por vía rectal.

Muestra D: Se disolvieron 1,4 g de fitosterol en 4,0 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a ello 48,9 g de monoleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 2,4 g de agua purificada que contiene 25,7 mg de carbonato de litio (4,8 mg de litio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 80 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra E: Se disolvieron 3,4 g de lecitina en 5,1 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 1,5 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 41,1 g de monoleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 5,4 g de agua purificada que contiene 65,6 mg de citrato de litio (4,8 mg de litio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 80 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Productos administrados:

- Muestra D: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 80 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg por vía rectal.
- Muestra E: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 80 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg por vía rectal.

A las ratas Sprague Dawley, 5 ratas por grupo, se les administró 160 µg de litio metálico/kg (80 µg/kg dos veces, 15 minutos de intervalo) por vía rectal con 2 formulaciones de litio en micelas inversas (muestras D y E). Estos productos se administraron gradualmente con una pipeta en el recto bajo, inmediatamente después del esfínter anal.

Los animales fueron sacrificados 2 horas después del último tratamiento y las muestras de sangre se recogieron por punción intracardiaca. La centrifugación se realizó a 4500 r/m durante 5 minutos para separar plasma de las células sanguíneas.

La concentración de litio en plasma y células sanguíneas se determinó por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICPMS).

Los resultados se muestran en la Figura 4, que demuestra que la adición de lecitina en micelas inversas de la muestra E no disminuyó la administración de litio y no cambió el reparto de litio entre el plasma y las células sanguíneas. Las micelas inversas según la invención son, de este modo, tan eficientes como aquellas que no contienen lecitina para la administración de bajas cantidades de iones metálicos. Además, permiten la administración de mayores cantidades de iones metálicos que las micelas inversas sin lecitina.

Ejemplo 6: Evaluación de la eficacia *in vivo* de micelas inversas formuladas con litio en un modelo de ratones con EAE de esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es la enfermedad inflamatoria autoinmune más común en el SNC. Se caracteriza por la desmielinización mediada por el sistema inmune y la neurodegeneración del SNC.

La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo experimental estándar ampliamente utilizado de las características clínicas, inmunológicas y neuropatológicas de la esclerosis múltiple.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de un pretratamiento con micelas inversas formuladas con litio según los siguientes procedimientos (muestra F y 16) en un modelo de EAE crónica inducida en ratones.

Muestra F: Se disolvieron 3,4 g de lecitina en 5,0 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 1,4 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 41,2 g de monooleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 5,4 g de agua que contiene 32,7 mg de citrato de litio (2,4 mg de litio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 40 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra 16: Se disolvieron 1,7 g de lecitina en 2,5 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,7 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 20,6 g de monooleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 2,7 g de agua a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Productos administrados:

- Muestra F: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 40 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg por vía rectal desde el día 0 al día 50.

- Muestra 16: Micelas inversas "vacías" preparadas según el procedimiento previo, administradas a 1 ml/kg por vía rectal desde el día 0 al día 50.

Para inducir EAE, a C57b1/6 se les inyectó por vía subcutánea en los días 0 y 7 150 µg de péptido MOG emulsionado en adyuvante completo de Freund (Laboratorios Difco) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Laboratorios Difco) a una concentración final de 5 mg/ml. Además, en los días 0 y 2 post-inmunización (p.i), los ratones recibieron 500 ng de toxina tóserfínica por vía intraperitoneal (Sigma Aldrich Corporation).

Estos ratones (4 por grupo) se trataron 5 días a la semana por vía rectal con litio formulado en las micelas inversas (muestra F) a partir del día 0 al día 50 post-inmunización. La muestra F de 40 µg de litio metálico/kg se administró gradualmente con una pipeta en el recto bajo, inmediatamente después del esfínter anal. Como control se utilizaron ratones tratados con micelas inversas "vacías" (muestra 16) en las mismas condiciones (4 ratones por grupo).

Los ratones se pesaron y puntuaron para los signos clínicos de la enfermedad a partir del día 10 post-inmunización hasta el día 50 (fines de semana excluidos). La evaluación clínica de la EAE se realizó diariamente según los siguientes criterios: 0= sin signos de enfermedad, 1= debilidad en la cola, 2= parálisis de la cola, 3= parálisis incompleta de una o dos patas traseras, 4= parálisis completa de las patas traseras, 5= moribundo, 6= muerte.

Los animales fueron sacrificados en el día 50 y las médulas espinales se recogieron y congelaron.

La cuantificación de la pérdida axonal se realizó en la médula espinal congelada después de la inmunotinción para neurofilamentos. Las secciones criostáticas de 14 µg se incubaron en primer lugar con un anticuerpo dirigido contra la proteína de neurofilamentos de 200 kDa (Serotec). Se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina (Laboratorios Vector) y después con estreptavidina – alexa flúor (Sondas moleculares). La densidad axonal se determinó mediante visualización de la inmunotinción para neurofilamentos utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan II).

Los resultados de las puntuaciones clínicas se muestran en la Figura 5, que demuestra que el litio en la formulación de micelas inversas que contiene lecitina (muestra F) es efectivo en prevenir la aparición de signos clínicos durante la fase aguda de la enfermedad y facilita la recuperación parcial durante la fase crónica de la enfermedad. Por el contrario, las micelas inversas "vacías" son ineficaces al disminuir la puntuación clínica (muestra 16).

Estos resultados se confirman mediante ensayos de inmunotinción presentados en la Figura 6, que demuestra que solo el tratamiento con litio en las micelas inversas (muestra F) previene la pérdida axonal en la médula espinal de ratones inducidos con EAE.

Ejemplo 7: Evaluación de la eficacia *in vivo* de micelas inversas formuladas con litio en el modelo de ratones R6/2 de la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurológico fatal heredado causado por una expansión de una repetición CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina. La pérdida selectiva de un subconjunto de las células cerebrales (neuronas) implica alteraciones psiquiátricas, motoras y cognitivas.

Los ratones R6/2 (Laboratorio Jackson) son un modelo transgénico ampliamente utilizado como modelo de la enfermedad de Huntington. Expresan el gen de la EH humano portador de aproximadamente 120 +/-5 expansiones

repetidas (CAG). Los ratones transgénicos exhiben un fenotipo neurológico progresivo que imita muchas de las características de la EH, incluyendo déficits de coordinación motora, actividad locomotora alterada, rendimiento cognitivo deteriorado y convulsiones.

El objetivo de este estudio fue evaluar mediante una batería estandarizada de análisis, el efecto neuroprotector del litio formulado en las micelas inversas según los siguientes procedimientos (muestras G y H) en ratones R6/2 en comparación con el litio no formulado administrado por vía oral. La coordinación motora y el equilibrio se evaluaron mediante la prueba de la varilla giratoria (Rotarod) y la prueba de natación en tanque. Los rendimientos cognitivos se evaluaron mediante la prueba de natación en tanque.

Muestra G: Se disolvió 1,0 g de fitosterol en 3,0 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a ello 36,5 g de monooleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 1,8 g de agua que contiene 9,7 mg de carbonato de litio (1,8 mg de litio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 40 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra H: Se disolvieron 9,4 g de lecitina en 8,5 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2,3 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 64,8 g de monooleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 4,0 g de agua purificada que contiene 24,3 mg de citrato de litio (1,8 mg de litio metálico) a 38,2 g de esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 40 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra 17: Se añadieron 4,0 g de agua purificada a 38,2 g de esta mezcla aceitosa preparada según la muestra H y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Productos administrados:

- Muestra G: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 40 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg por vía rectal durante al menos 8 semanas.
- Muestra H: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 40 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg por vía rectal durante al menos 8 semanas.
- Muestra 17: Micelas inversas "vacías" preparadas según el procedimiento previo, administradas a 1 ml/kg por vía rectal durante al menos 8 semanas.
- Litio sin formular: litio en una solución de 3,2 mg de litio metálico/ml, administrado a 5 ml/kg/d por vía oral (por sonda nasogástrica) durante al menos 8 semanas.

Como se describe en los sucesivos, se trataron R6/2 con 8-9 semanas de edad (aparición de los primeros signos clínicos) 5 días a la semana durante al menos 8 semanas con litio en solución (grupo 4, 10 ratones por grupo, respectivamente) o formulado en micelas inversas (muestras G y H). El litio en solución se administró por sonda nasogástrica a 16 mg de litio metálico/kg utilizando un jeringa de plástico provista de un tubo curvo metálico de sonda nasogástrica. Las muestras G y H de 40 µg de litio metálico/kg se administraron gradualmente con una pipeta en el recto bajo, inmediatamente después del esfínter anal (grupos 1 y 2, 10 y 9 ratones por grupo). Como control se utilizaron ratones R6/2 y ratones de tipo salvaje tratados en las mismas condiciones con micelas inversas "vacías" (muestra 17) (grupo 3 y 5, 8 y 6 ratones por grupo).

Las pruebas de Rotarod se realizaron antes y durante la 4ª y 6ª semana de tratamiento utilizando un aparato Rota Rod (UGO Basile 47600, diámetro de rotación de la varilla de 3 cm). Después de una prueba de aclimatación de 15 minutos, los ratones realizaron 2 ensayos a 5 rpm. Se registró la latencia a la que cada ratón cae de la varilla.

Las pruebas de natación se realizaron utilizando un tanque llenado con agua con una profundidad de 20 cm y una plataforma de escape visible localizada al final del lado del tanque. Durante la 4ª semana de tratamiento, se registró la latencia para alcanzar la plataforma y la velocidad de nado 5 veces al día durante 5 días consecutivos.

En la figura 7 se muestran los resultados de la prueba de Rotarod, que demuestra con claridad que ambas formulaciones de litio metálico en micelas inversas (muestras G y H) mantienen la coordinación motora de los ratones R6/2. Además, el efecto de la muestra H formulada con lecitina administrada a una dosis de 40 µg/kg fue mayor a la obtenida con litio mediante sonda nasogástrica por vía oral en 16 mg/kg. Por el contrario, el tratamiento con micelas inversas que no contienen metal (muestra 17) no fue eficaz en mantener la coordinación motora de los ratones R6/2.

Los resultados de la velocidad de nado mostrados en la Figura 8, confirman que los ratones R6/2 tratados con litio en ambas formulaciones de micelas inversas (muestras G y H) tienen mejores rendimientos motores que los ratones

R6/2 tratados con litio mediante sonda nasogástrica por vía oral en 16 mg/kg o con micelas inversas que no contienen metal (muestra 17).

Los resultados del rendimiento cognitivo se muestran en la Figura 9, que demuestra con claridad que ambas formulaciones de litio metálico en micelas inversas (muestras G y H) mantienen la capacidad de R6/2 para aprender una tarea sencilla: elegir la dirección correcta para alcanzar la plataforma. Por el contrario, las micelas inversas que no contienen metal (muestra 17) son ineficaces en mantener los rendimientos cognitivos.

Las micelas inversas según la invención son, de este modo, tan eficientes como aquellas que no contienen lecitina para la administración de bajas cantidades de iones metálicos. Adicionalmente, permiten la administración de mayores cantidades de iones metálicos que las micelas inversas sin lecitina.

Cepa de ratón	Grupos	Número de animales	Tratamiento	Dosis administrada (µg/kg/d)	Volumen administrado (ml/kg/d)
R6/2	1	10	Muestra G	40	1
	2	9	Muestra H	40	1
	3	8	Muestra 17	0	1
	4	10	Solución de litio	16000	5
Tipo salvaje	5	6	Muestra 17	0	1

Ejemplo 8: Formulación de micelas inversas con alta concentración de litio

El objetivo de este estudio fue formular litio en micelas inversas en 600 µg/ml según la invención.

Muestra I: Se disolvieron 6,6 g de lecitina en 5,9 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 1,6 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 45,3 g de monoleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 6,3 g de agua purificada que contiene 567,7 mg de citrato de litio (41,9 mg de litio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 600 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

La formación de la microemulsión termodinámicamente estable según el procedimiento previo se evaluó mediante la determinación visual de su limpidez tras 3 meses a 40 °C.

Este experimento muestra que la adición de lecitina al 10 % permite la formación de una microemulsión transparente termodinámicamente estable con 600 µg/ml de litio metálico.

Ejemplo 9: Evaluación de la eficacia *in vivo* de micelas inversas formuladas con litio en un modelo de ratones de enfermedad priónica.

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son una familia de trastornos neurodegenerativos progresivos fatales y raros causados por un agente infeccioso (prión) compuesto de proteínas de forma mal plegada. Este agente puede inducir el plegamiento anómalo de las proteínas priónicas celulares normales en el cerebro, dando lugar al daño cerebral (pérdida neuronal...) y síntomas asociados (demencia...).

Los ratones C57b1/6J inoculados por vía intracerebral con homogeneizados cerebrales infectados con prión ME7 mueren normalmente entre 165 y 175 días después de la inoculación. La enfermedad se caracteriza por la vacuolización y la pérdida neuronal, típicamente con una administración bilateral, simétrica así como la proliferación de astrocitos y la acumulación de proteína priónica.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia del tratamiento con micelas inversas formuladas con litio según el siguiente procedimiento (muestra J) en la supervivencia de ratones infectados con prión en comparación con litio no formulado administrado por vía oral a una dosis más alta.

Muestra J: Se disolvieron 23,5 g de lecitina en 21,2 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla se añadieron 5,9 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 162,0 g de monoleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 10,8 g de agua purificada que contenía 259,0 mg de citrato de litio (19,2 mg de litio metálico) a 102,0 g de esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 160 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra 18: Se añadieron 10,8 g de agua purificada a 102,0 g de la mezcla aceitosa preparada según la muestra J y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Productos administrados:

- Muestra J: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 160 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg por vía rectal a partir de 90 días después de la inoculación hasta la muerte.
- Muestra 18: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo, administradas a 1 ml/kg por vía rectal a partir de 90 días después de la inoculación hasta la muerte.
- Litio sin formular: litio en solución en 3,2 mg de litio metálico/ml, administrado a 5 ml/kg/d por vía oral (por sonda nasogástrica) a partir de 90 días después de la inoculación hasta la muerte.

Se inocularon 20 µl de homogeneizados cerebrales con 1 % de prión ME7 con anestesia general en el cerebro de ratones C57b1/6 de 5 semanas de edad para inducir enfermedad. Estos ratones se trataron 5 días a la semana (fines de semana excluidos) con litio en solución (14 ratones por grupo) o formulado en micelas inversas (muestra J) (14 ratones por grupo) a partir de 90 días después de la inoculación (en la fase post-sintomática) hasta la muerte. El litio en solución se administró mediante sonda nasogástrica en 16 mg de litio metálico/kg utilizando una jeringa de plástico provista de un tubo curvo metálico de sonda nasogástrica. La muestra J de 160 µg de litio metálico/kg se administró gradualmente en una pipeta en el recto bajo, inmediatamente después del esfínter anal. Como control se utilizaron ratones inoculados con prión tratados en las mismas condiciones con micelas inversas "vacías" (muestra 18) (10 ratones por grupo).

Los resultados de supervivencia se muestran en la Figura 10, que demuestra con claridad que el tratamiento con litio en solución en 16 mg/kg o formulado en micelas inversas en 160 µg/kg (muestra J) aumenta la supervivencia de los ratones infectados con prión en comparación con el tratamiento con micelas inversas que no contiene metal (muestra 18).

Este experimento muestra que, con una eficacia equivalente, la formulación en micelas inversas según la invención proporciona una disminución en la dosis de litio en 100 veces en comparación a la dosis de litio en solución.

Ejemplo 10: Evaluación de la eficacia *in vivo* de micelas inversas formuladas con litio en un modelo conductual en ratones de depresión

El trastorno bipolar es una enfermedad psiquiátrica descrita como un trastorno del estado de ánimo. Se define por la alternancia de episodios de manía y depresión. El tratamiento para estabilizar el estado de ánimo se basa en la administración de altas dosis de litio que tiene efectos anti maniacos y antidepresivos agudos y efectos profilácticos a largo plazo.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de un pretratamiento con micelas inversas formuladas con litio según el siguiente procedimiento (muestra K) en un modelo conductual estándar de ratones ampliamente utilizado de depresión (prueba de suspensión por la cola) en comparación con el litio no formulado administrado por vía oral en dosis más altas.

Muestra K: Se disolvieron 28,2 g de lecitina en 24,5 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 7,0 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 194,4 g de monooleato de glicerol y se llevó a cabo agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 7,2 g de agua purificada que contiene 161,6 mg de citrato de litio (12,0 mg de litio metálico) a 68,0 g de esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 150 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,94).

Muestra 19: Se añadieron 7,2 g de agua purificada a 68,0 g de la mezcla aceitosa preparada según la muestra K y se agitó a temperatura ambiente a 700 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Productos administrados:

- Muestra K: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo en 150 µg de litio metálico/ml, administradas a 1 ml/kg/d por vía rectal durante 4 semanas antes de la prueba.
- Muestra 19: Micelas inversas preparadas según el procedimiento previo, administradas a 1 ml/kg/d por vía rectal durante 4 semanas antes de la prueba.
- Litio sin formular: litio en solución en 3,2 mg de litio metálico/ml, administrado a 5 ml/kg/d por vía oral (por sonda nasogástrica) durante 4 semanas antes de la prueba.

Los ratones C57b1/6 se trataron 5 días a la semana (fines de semana excluidos) durante 4 semanas con litio en solución (12 ratones por grupo) o formulado en micelas inversas (muestra K) (12 ratones por grupo). El litio en solución se administró mediante sonda nasogástrica a 16 mg de litio metálico/kg utilizando una jeringa de plástico

provista de un tubo curvo metálico de sonda nasogástrica. La muestra K de 150 µg de litio metálico/kg se administró gradualmente con una pipeta en el recto bajo, inmediatamente después del esfínter anal. Como control se utilizaron ratones tratados en las mismas condiciones con micelas inversas “vacías” (muestra 19) (12 ratones por grupo).

- 5 Después de un tratamiento de 4 semanas, los ratones se suspendieron por las colas durante 6 minutos y el comportamiento similar a la depresión se caracterizó por el tiempo que se está inmóvil. Se registró el tiempo total de inmovilidad.
- 10 Los resultados del ensayo de suspensión por la cola se muestran en la Figura 11, que demuestra con claridad que los tiempos de inmovilidad de los ratones tratados con litio en solución en 16 mg/kg o formulado en micelas inversas en 150 µg/kg (muestra K) son significativamente inferiores al tiempo de inmovilidad de los ratones tratados con micelas inversas que no contienen metal (muestra 19).
- 15 Este comportamiento muestra que, el comportamiento similar a la depresión inducido por la prueba de suspensión por la cola, se alivia por ambos tratamientos de litio. Además, la formulación de litio en micelas inversas según la invención proporciona una disminución de dosis en 100 veces en comparación con la dosis de litio en solución.

Ejemplo 11: Formulación de micelas inversas con alta concentración de litio

- 20 El objetivo de este estudio fue formular litio en micelas inversas en 1200 µg/ml según la preparación.
- 25 Muestra L: Se disolvieron 569,9 g de lecitina en 342,1 g de etanol absoluto mediante agitación magnética a 100 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 95,2 g de fitosterol a la mezcla y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron a esta 2313,4 g de monoleato de glicerol y se llevó a acabo agitación magnética a 200 r/min durante 120 minutos a 37 °C. Se añadieron 480,0 g de agua purificada que contiene 6478,1 mg de citrato de litio (480,0 mg de litio metálico) a esta mezcla aceitosa y se agitó a temperatura ambiente a 200 r/min durante 15 minutos para formar micelas inversas que contienen 1200 µg de litio metálico/ml (densidad de 0,95).
- 30 La formación de la microemulsión estable termodinámicamente según el procedimiento previo se evaluó mediante la determinación visual de su limpidez.
- Este experimento muestra que la adición de lecitina al 15 % permite la formación de una microemulsión transparente termodinámicamente estable con 1200 µg/ml de litio metálico.

REIVINDICACIONES

1. Sistema micelar inverso que comprende al menos un ion metálico, un estero, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol y agua, en el que la relación en peso de fosfolípido o esfingolípido/acilglicerol es de 0,05 a 0,40.

2. Sistema micelar inverso según la reivindicación 1, en el que las micelas presentan núcleos acuosos de aproximadamente 4 nm, preferentemente de 3 a 5 nm, más preferentemente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm.

3. Sistema micelar inverso según la reivindicación 1 o 2, que se puede obtener mediante el siguiente procedimiento:

(a) poner en contacto (i) estero, (ii) acilglicerol, (iii) fosfolípido o esfingolípido, (iv) alcohol, (v) agua, y (vi) al menos un ion metálico;

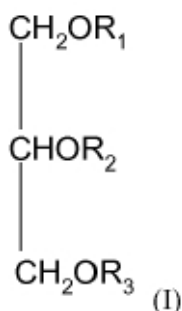
(b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a) a 40 °C o menos, y durante un tiempo suficiente para obtener la formación de micelas inversas.

4. Sistema micelar inverso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la relación en peso de estero/acilglicerol oscila de 0,015 a 0,5, más preferentemente de 0,03 a 0,04.

5. Sistema micelar inverso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que la agitación de la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura que oscila de 15 °C a 40 °C, o de 25 °C a 40 °C, o más específicamente de 30 °C a 37 °C.

6. Sistema micelar inverso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fosfolípido es fosfatidilcolina.

7. Sistema micelar inverso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que acilglicerol presenta la siguiente fórmula (I):



en la que:

- R₁ es un resto de acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, un átomo de hidrógeno, o una mono-, di- o tri- galactosa o glucosa;

- R₂ es un resto de acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 2 y 18 átomos de carbono;

- R₃ es un resto de acilo de un ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, o un átomo de hidrógeno,

preferentemente, el acilglicerol se selecciona entre el grupo que consiste en 1,2-dioleína y 1-oleoil-2-acetil glicerol.

8. Sistema micelar inverso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que estero es sitosterol o colesterol.

9. Sistema micelar inverso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ion metálico se selecciona entre el grupo que consiste en litio, zinc, niobio, vanadio, selenio, molibdeno, cromo, antimonio, estaño, oro, rutenio, paladio, platino, estroncio, arsénico y manganeso.

10. Composición farmacéutica que comprende un sistema micelar inverso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y al menos un portador, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación previa para suministrar al menos un ion metálico a un mamífero, comprendiendo dicho suministro la administración mucosa de la composición farmacéutica.

12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno seleccionado entre las patologías del sistema nervioso central, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, cánceres, tales como tumores respiratorios o leucemia promielocítica aguda, síndromes de inmunodeficiencia adquirida, cancerología, osteoporosis, enfermedades asociadas al estrés oxidativo, trastornos bipolares, depresión y trastornos inflamatorios.

13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el ion metálico es litio, y en la que la enfermedad o trastorno se selecciona entre las patologías del SNC y enfermedades neurodegenerativas.

14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el ion metálico es vanadio y la enfermedad o trastorno se selecciona entre diabetes tipo 2, resistencia a la insulina y síndrome metabólico; el ion metálico es estroncio y la enfermedad o trastorno es osteoporosis; o el ion metálico es manganeso y la enfermedad o trastorno se selecciona entre trastornos asociados al estrés oxidativo.

15. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que los iones metálicos en el sistema micelar inverso atraviesan la barrera hematoencefálica, y para el uso en el que la enfermedad o trastorno se selecciona más particularmente entre las enfermedades genéticas, tumorales, virales y degenerativas en el sistema nervioso central.

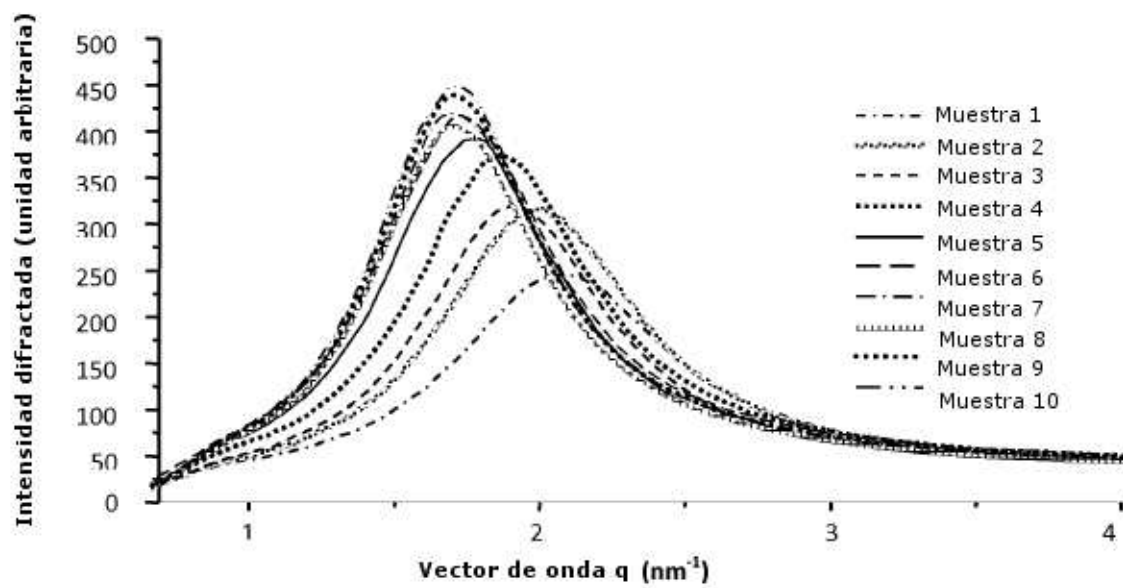


FIGURA 1a

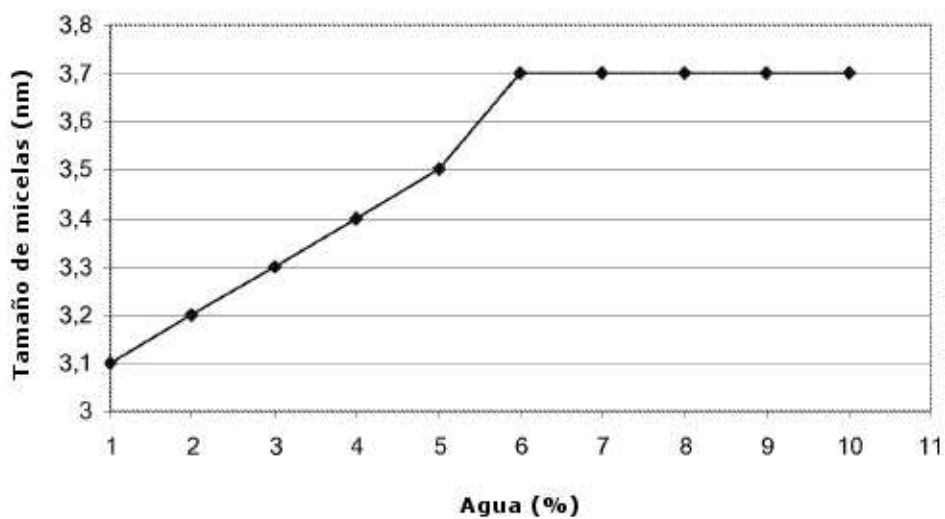


FIGURA 1b

FIGURA 1

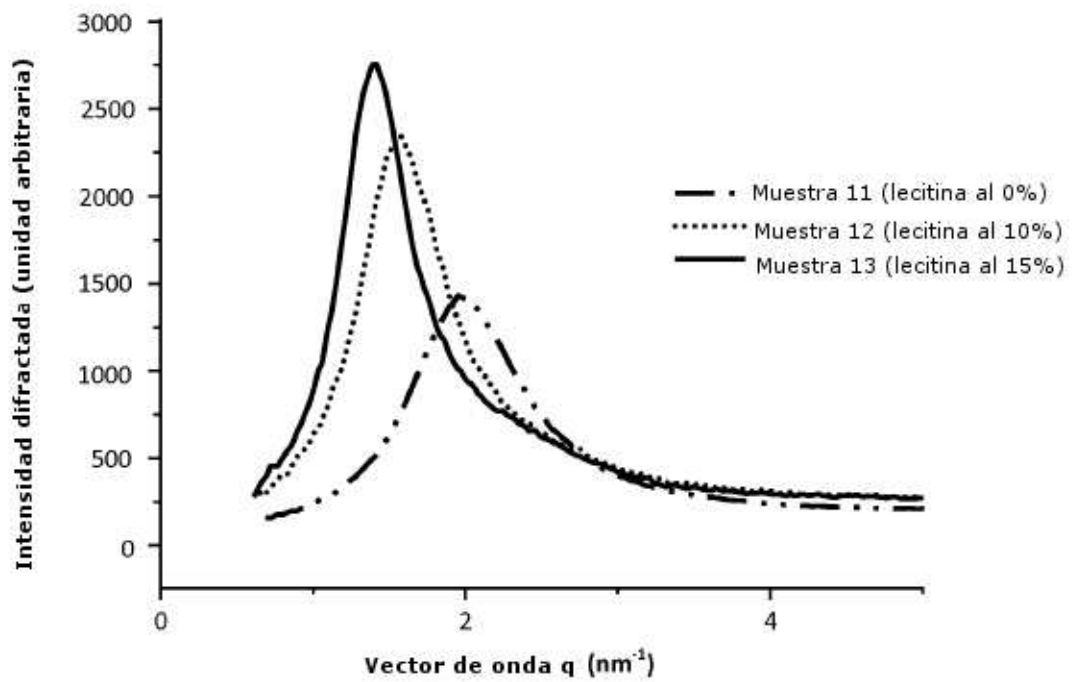


FIGURA 2a

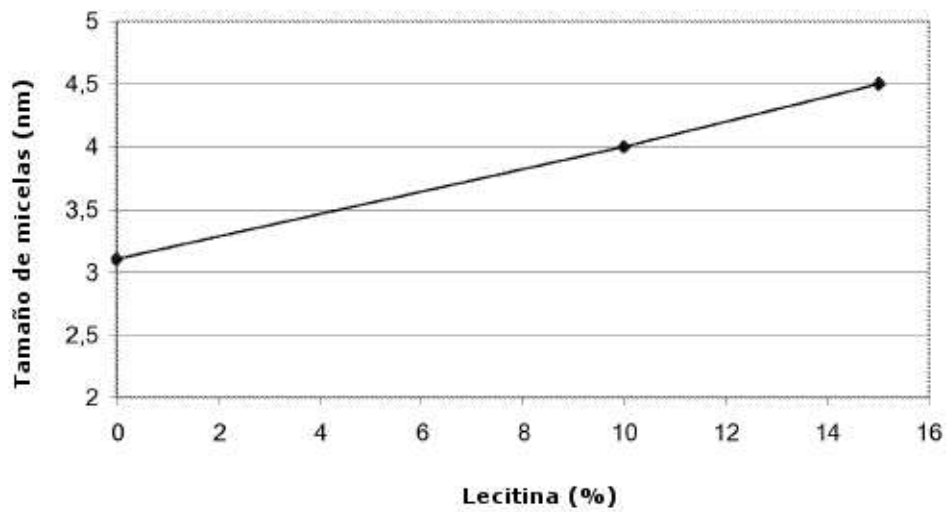


FIGURA 2b

FIGURA 2

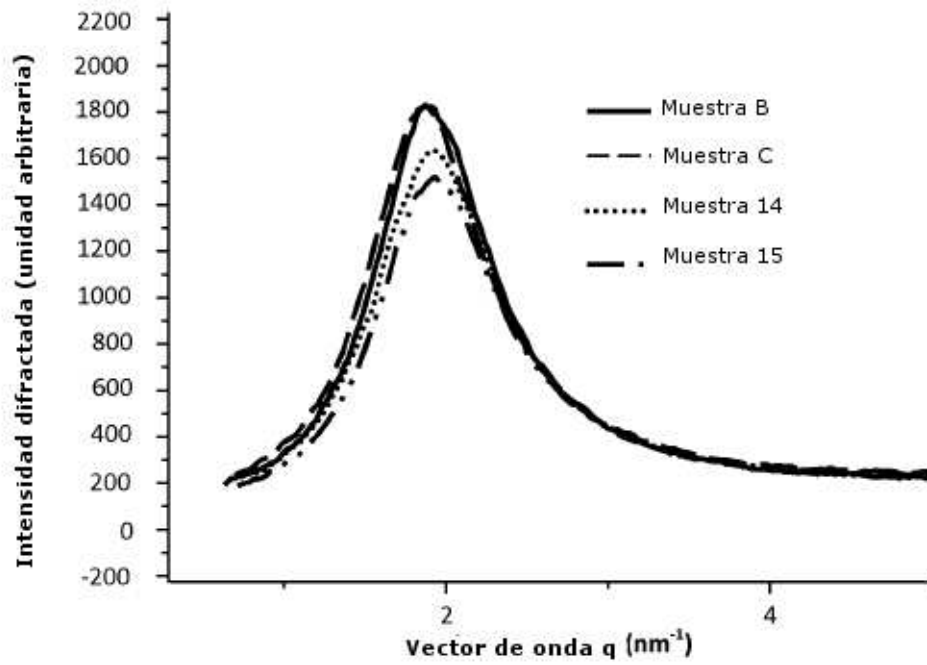


FIGURA 3

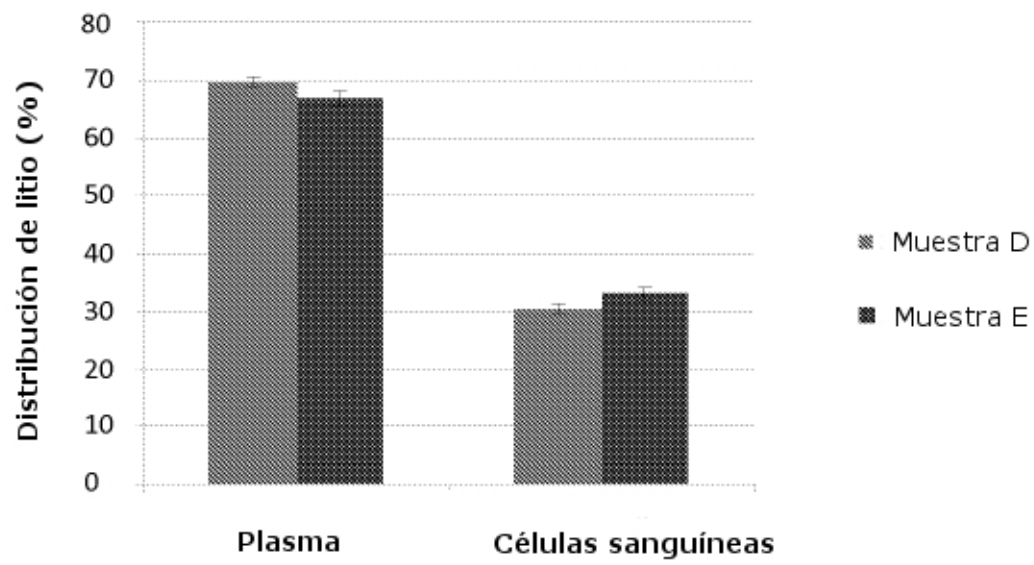


FIGURA 4

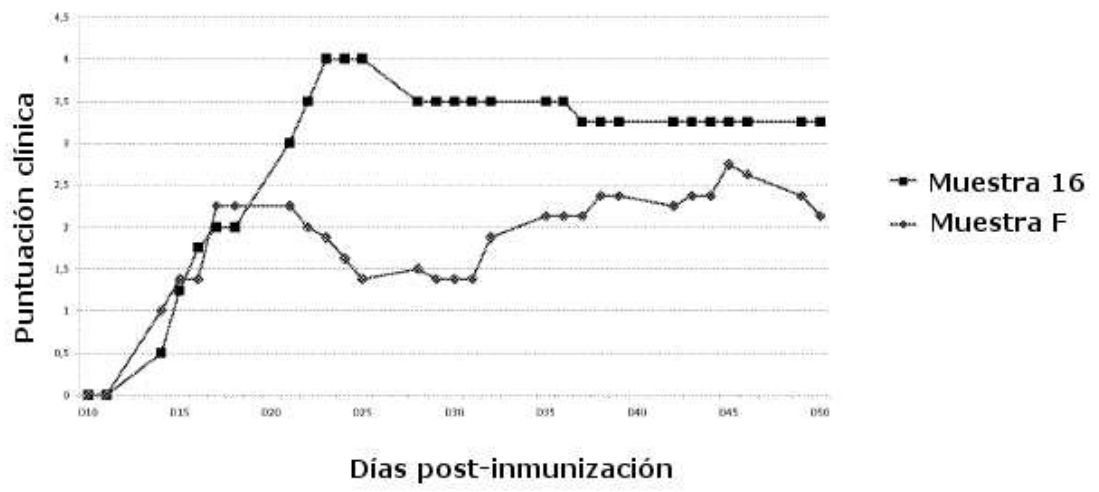


FIGURA 5

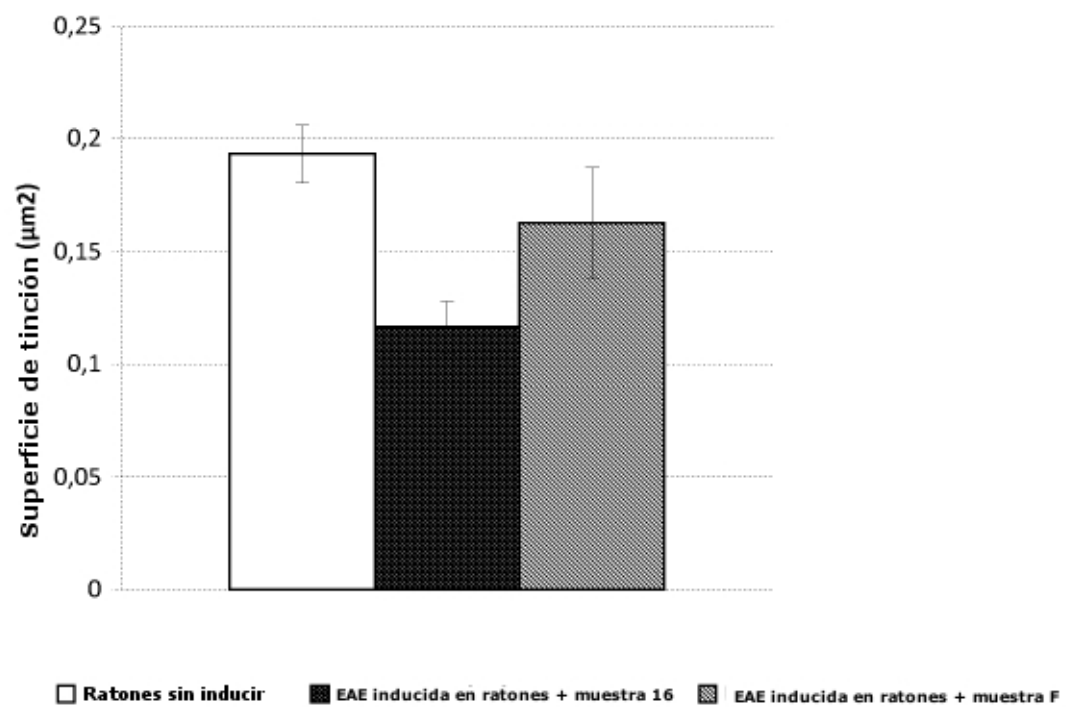


FIGURA 6

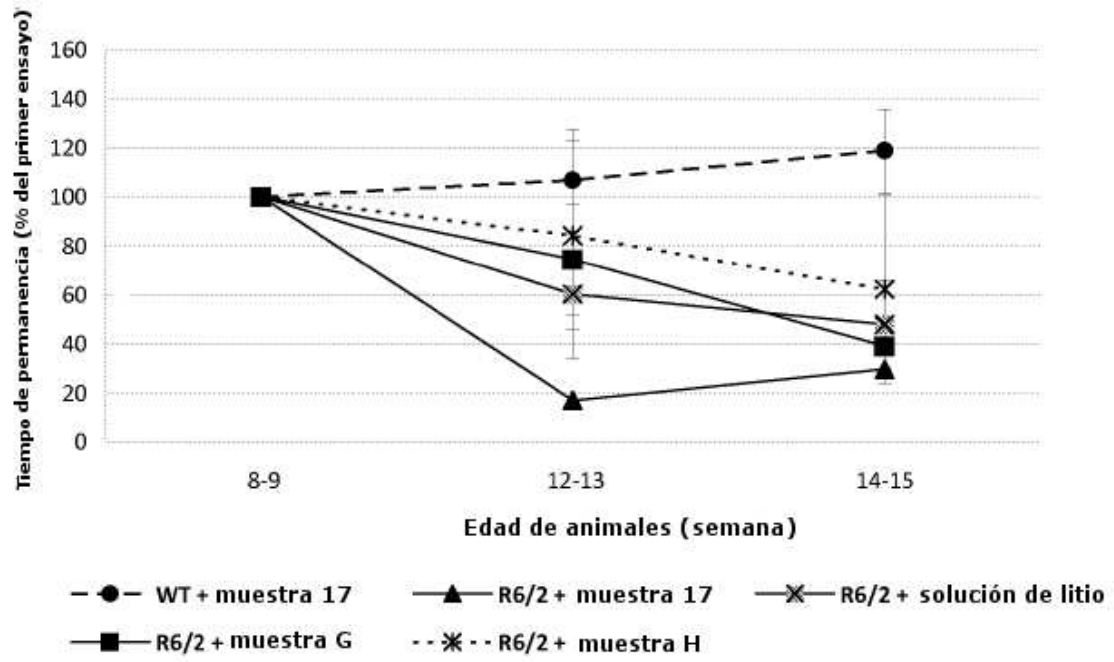


FIGURA 7

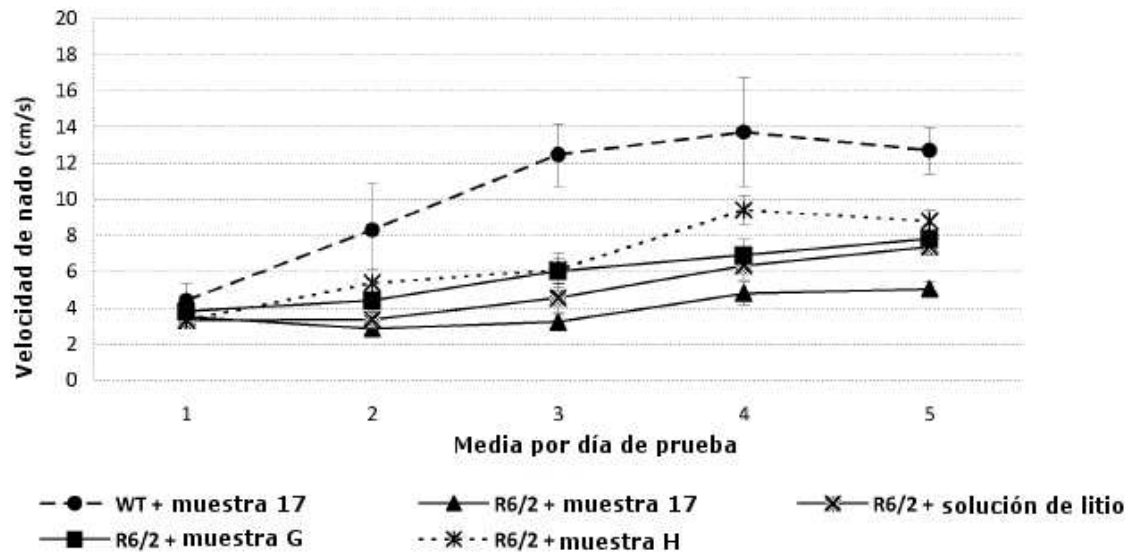


FIGURA 8

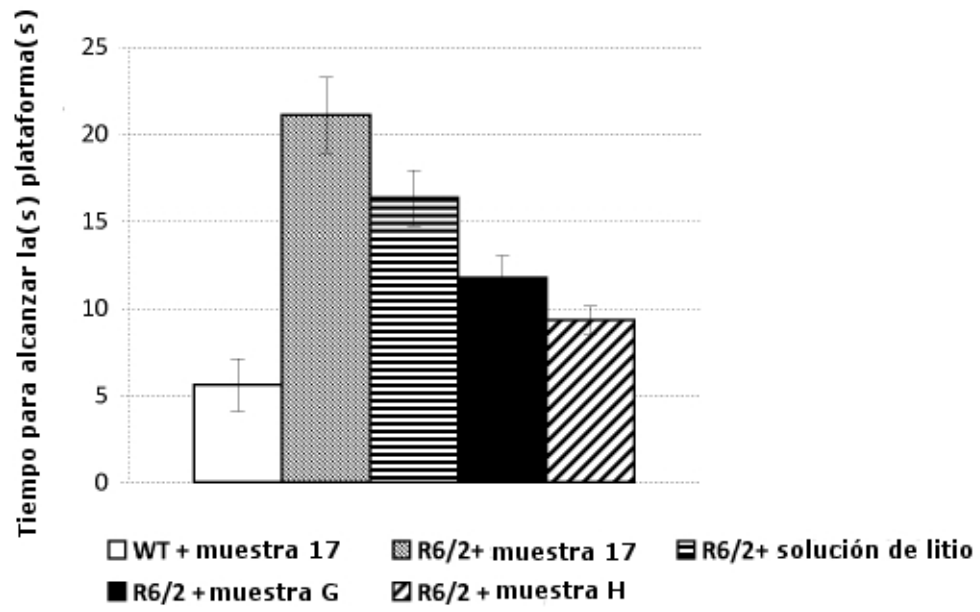


FIGURA 9

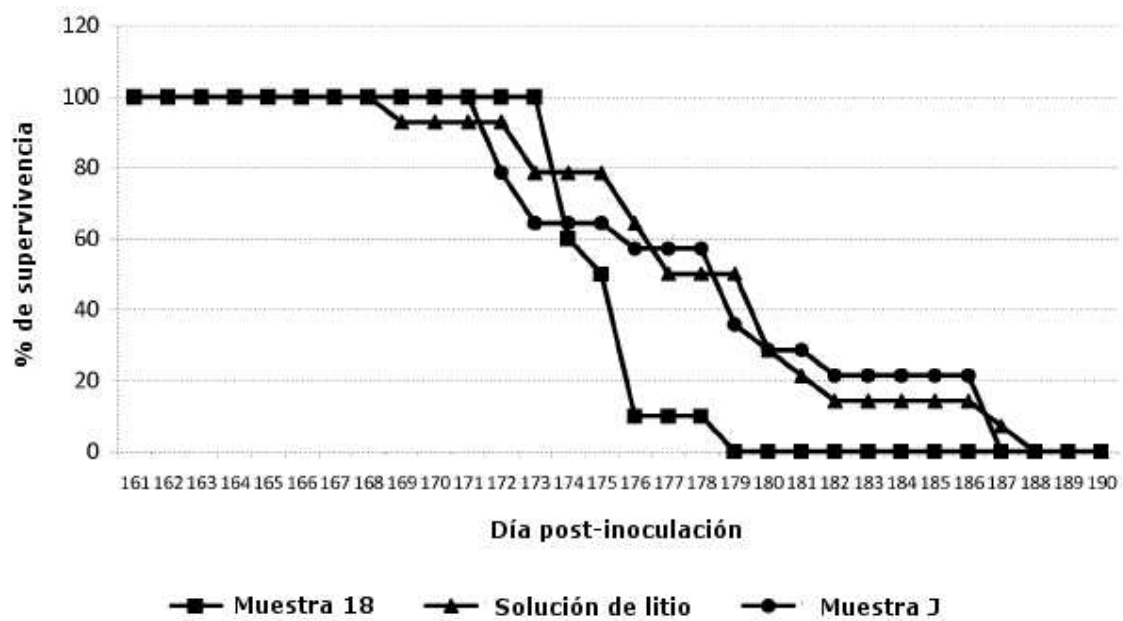


FIGURA 10

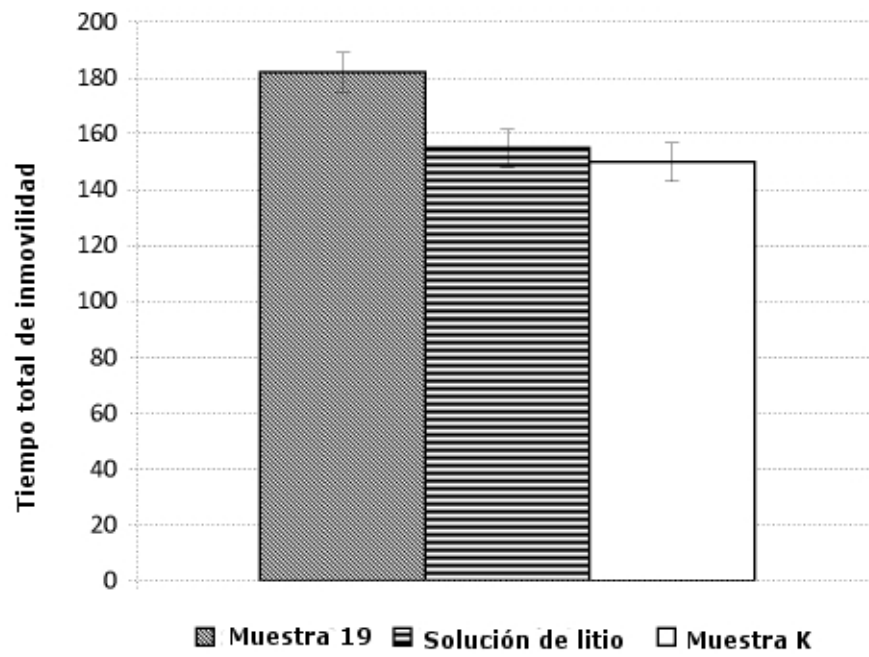


FIGURA 11