

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 119**

51 Int. Cl.:

A61Q 5/12	(2006.01) C08L 33/06	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01) A23L 5/00	(2006.01)
A61K 8/81	(2006.01) C08J 3/07	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 8/11	(2006.01)	
A61K 9/51	(2006.01)	
A61K 31/00	(2006.01)	
C08J 3/12	(2006.01)	
C08J 3/14	(2006.01)	
C08F 265/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2012** **PCT/EP2012/056900**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO12140252**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2012** **E 12715953 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2699625**

54 Título: **Nanopartículas que comprenden ésteres de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) y los usos de las mismas**

30 Prioridad:

15.04.2011 EP 11382115

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2019

73 Titular/es:

BIONANOPLUS, S.L. (100.0%)
Polígono Mocholí, Plaza Cein, 5 - nave B14
31110 Noáin- Navarra, ES

72 Inventor/es:

SALMAN, HESHAM H.A. y
GOÑI AZCARATE, IZASKUN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 730 119 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

Nanopartículas que comprenden ésteres de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) y los usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un sistema transportador de nanopartículas biocompatibles que comprende nanopartículas a base de semiésteres de copolímeros de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) que tienen una alta capacidad de bioadhesión con la mucosa y una alta estabilidad en medios acuosos a largo plazo. Las nanopartículas son capaces de incorporar de manera eficiente productos de interés para la Agricultura, Cosmética, Alimentación y Farmacia. La invención también se refiere al procedimiento para la fabricación de dichas nanopartículas, los usos y aplicaciones de las mismas.

15 **Antecedentes de la invención**

Las nanopartículas o micropartículas poliméricas bioadhesivas han sido consideradas como sistemas particulares prometedores para transportar muchos compuestos, incluso moléculas terapéuticas. Las propiedades bioadhesivas de estos sistemas ofrecen la posibilidad de crear una fuerte interacción y un tiempo de contacto prolongado con las superficies de las mucosas que dará lugar a un aumento significativo de la absorción de los fármacos y a una mejora del cumplimiento del paciente. Diferentes estudios y revisiones describen las beneficiosas aplicaciones de las vías de administración bucal, nasal, ocular, oral, rectal y vaginal y dan ejemplos de lo que puede lograrse *in vivo* cuando se utilizan formulaciones bioadhesivas.

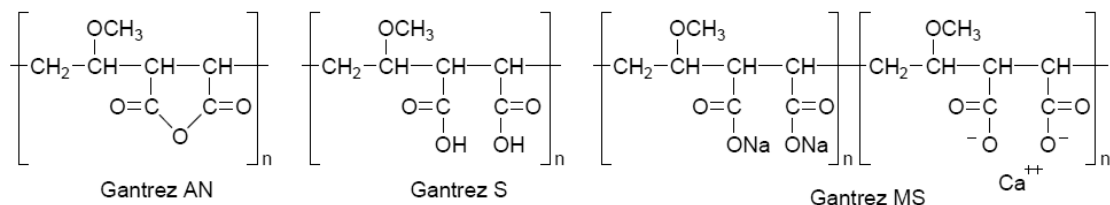
Micropartículas y nanopartículas bioadhesivas bucales permiten lograr una liberación local del fármaco en la mucosa. Respecto a la cavidad oral, se ha descrito el tratamiento del dolor de muelas, infecciones bacterianas y fúngicas, aftas, el liquen plano y la inflamación y estomatitis dental. Un gran número de estudios ha descrito el uso de sistemas transportadores bucales para controlar la liberación de fármacos como el fentanilo, denbufilina, sulfato de zinc, clorhexidina y teofilina. Microesferas mucoadhesivas intranasales basadas en polímeros bioadhesivos como el quitosano, ácido hialurónico, y otros polímeros, mejoran la biodisponibilidad del fármaco [1-3], incluso la desmopresina. Del mismo modo, estos sistemas mejoran la biodisponibilidad oral de las moléculas biológicamente activas como la calcitonina. Además, micro y nano transportadores bioadhesivos se han utilizado para la aplicación local de muchos fármacos en oftalmología donde se ha logrado liberación prolongada del fármaco sin producir la sensación de un cuerpo extraño o visión borrosa. Nanopartículas o micropartículas mucoadhesivas también se han utilizado para las estrategias de administración local incluidos los fines de transporte por la piel o folículo piloso. Un nuevo enfoque de la preparación de micropartículas mucoadhesivas ha sido considerado como un sistema innovador de administración vaginal para el nitrato de econazol en el tratamiento de la *Candida albicans*. Una de las áreas más interesantes de investigación, dentro del campo de las micropartículas y nanopartículas bioadhesivas, se ha centrado en la vacunación e inmunoterapia por vía mucosa para mejorar la estimulación de la respuesta de anticuerpos en el suero, así como también en las secreciones de la mucosa local y distal. Ventajas significativas relacionadas con el uso de estos enfoques incluyen la facilidad de administración y la generación tanto de la inmunidad sistémica como mucosa.

Numerosos polímeros bioadhesivos han sido descritos para su aplicación en la obtención de sistemas particulares bioadhesivos, incluyendo el ácido poliacrílico (PAA), alcohol polivinílico (PVA), derivados de la celulosa y el alginato sódico. Varios copolímeros del ácido acrílico, como el copolímero del ácido acrílico/polietilenglicol monometil éter y el copolímero del ácido acrílico-acrilato de 2-etilhexilo también han sido estudiados. PAA, el quitosano y sus derivados, hidroxipropilcelulosa (HPC), PVA, gelatina, carragenano, carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC), y el ácido hialurónico, han demostrado su capacidad de interaccionar con la mucosa bucal.

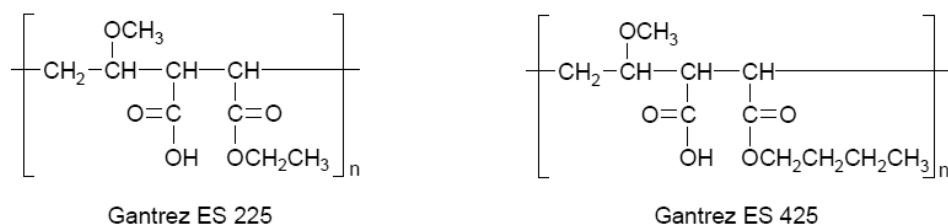
Otros polímeros bioadhesivos prometedores son los que están comercializados por International Specialty Products (ISP) bajo la marca Gantrez®, es decir, copolímeros de poli metil vinil éter-co-anhídrido maleico (PVM/MA), que se han utilizado como adhesivos, aglutinantes, fijadores, mucoadhesivos para estrategias de administración oral, estrategias de adhesión bucal, sistemas de liberación transdérmicos y otras aplicaciones cosméticas como productos para el peinado del cabello. Copolímeros de Gantrez® incluyen:

- Copolímeros de Gantrez® AN, la forma anhídrida, que se presentan como un polvo blanco insoluble en agua que pueden ser fácilmente hidrolizados produciendo una solución transparente del ácido libre soluble en agua (Gantrez® S);
- Copolímeros de Gantrez® S, la forma de ácido libre, que se suministran en solución o en forma de polvo;
- Copolímeros de Gantrez® MS, una sal mixta de copolímeros de sodio/calcio PVM/MA, que se presentan como un polvo, que pueden ser hidrolizados lentamente en agua, y
- Copolímeros de Gantrez® ES, la forma semiéster de diferentes longitudes de cadena alquílica y de pesos moleculares del copolímero de PVM/MA, llamados Gantrez® ES 225 (éster monoetilico), Gantrez® ES 425 (éster

monobutílico) y Gantrez® ES335I (éster isopropílico); estos copolímeros son insolubles en agua pero son solubles en agua cuando son neutralizados por bases en solución acuosa, y se suministran como soluciones alcohólicas.



5



Copolímeros sintéticos de PVM/MA tienen aplicaciones muy diferentes. A modo ilustrativo, copolímeros de Gantrez® AN se han usado ampliamente como espesante y floculante, adhesivo dental, excipiente en comprimidos orales, excipiente en parches transdérmicos, etc. Además, se ha descrito el uso de estos copolímeros para la liberación controlada de fármacos y, en forma de matriz, para la liberación tópica de fármacos en el ojo, así como en la fabricación de micropartículas o nanopartículas bioadhesivas con fines de transportar fármacos o vacunación por vía mucosa [4-5]. Copolímeros de Gantrez® S se utilizan en pastas de dientes y enjuagues bucales, principalmente como polímero adhesivo para productos de higiene bucal para prolongar la liberación de los agentes antimicrobianos. Copolímeros de Gantrez® MS se utilizan en los adhesivos para dentaduras postizas, adhesivos de ostomía y en los transportadores tópicos para aplicaciones en la mucosa; se han descrito micro- y nano-partículas a base de copolímero de Gantrez® MS para fines de liberación local en la cavidad bucal. Copolímeros de Gantrez® ES se utilizan como agentes de recubrimiento entérico y en adhesivos de ostomía; se han descrito micropartículas a base del semiestér de n-hexilo del copolímero de PVM/MA conteniendo ketorolaco trometamina con un diámetro medio de 100-150 μm [6] a pesar de que la aplicación final de dichas micropartículas está limitada, ya que normalmente se degradan *in vitro* en un periodo de 4-5 días.

Muchas investigaciones han utilizado copolímeros de PVM/MA para obtener sistemas micro o nano-particulados.

Los nanosistemas basados en el copolímero de Gantrez® AN se obtienen principalmente por el método de desplazamiento de disolvente. En este sentido, se ha descrito la desolvatación del copolímero de PVM/MA en acetona con una fase hidroalcohólica seguido por reticulación de nanopartículas formado con agentes reticulantes (por ejemplo, poliaminas o proteínas). La estabilidad en medios acuosos de estos nanosistemas es bastante baja debido a la hidrólisis del copolímero de Gantrez® AN en el copolímero de Gantrez® S, que es soluble en agua. En un medio acuoso, dichas nanopartículas pueden hidrolizarse rápidamente. La estabilización de los nanosistemas de Gantrez® AN en medio acuoso necesita una modificación química y funcionalización del copolímero de PVM/MA con un agente reticulante (*cross-linker*), por ejemplo, un compuesto de poliamina como la espermidina o la espermina (aunque esta reacción de acoplamiento necesita al menos 20 h bajo determinadas condiciones), un compuesto de diamina como el compuesto tóxico 1,3-diaminopropano (DP), o una molécula inmunogénica como la albúmina sérica bovina (BSA). La adición de DP solo mejora débilmente la estabilidad de las nanopartículas de Gantrez® AN en solución salina tamponada con fosfato (PBS) [7]. Otras desventajas de la reticulación de las nanopartículas de PVM/MA incluyen el aumento significativo en el tamaño de las nanopartículas y la disminución dramática de la capacidad bioadhesiva de estos nanosistemas. Con el fin de mejorar la capacidad bioadhesiva de las nanopartículas de Gantrez® AN, dichas nanopartículas pueden ser modificadas por polímeros hidrosolubles, tales como polietilenglicoles (PEG). Sin embargo, esta modificación conlleva algunos inconvenientes como, por ejemplo, la modificación de los copolímeros de anhídrido maleico con un compuesto que contiene hidroxilo para formar derivados de ésteres necesitan altas temperaturas y condiciones ácidas agresivas, y el uso de PEG hidrofílicos (con bajo contenido de OH) puede transformar el copolímero de Gantrez® AN en un derivado más hidrosoluble y en consecuencia disminuye la estabilidad de las nanopartículas resultantes en medio acuoso.

Además, se han descrito algunas dificultades en relación con la capacidad de las nanopartículas de Gantrez® AN para incorporar fármacos hidrosolubles en la fase orgánica del polímero (una solución de Gantrez® AN en acetona). Como es sabido, los fármacos hidrosolubles no son solubles en acetona y pueden formar cristales de tamaño

grande que pueden interferir con la formación de las nanopartículas, una vez se añade una solución hidroalcohólica para precipitar el Gantrez® AN en forma de nanosistemas. Por esa razón, un fármaco hidrosoluble, 5-fluorouridina (FURD), fue cargado en nanopartículas de Gantrez® AN sólo mediante la incubación del fármaco con las nanopartículas previamente formadas y, en consecuencia, se obtuvo una muy baja eficacia de encapsulación (alrededor del 13%) [8].

Con respecto a la capacidad de las nanopartículas de Gantrez® AN de incorporar moléculas insolubles o con una baja solubilidad en agua, ha sido necesario el uso de agentes complejantes como las ciclodextrinas (CD) o solubilizantes, incluyendo el PEG y aminoácidos (por ejemplo, la glicina) con el fin de mejorar la incorporación de estos tipos de moléculas en las nanopartículas de Gantrez® AN. Realmente, si no se utilizan agentes complejantes o solubilizantes, el fármaco libre, que no se ha incorporado en las nanopartículas de Gantrez® AN, se precipitará en forma de grandes cristales en la suspensión acuosa final de las nanopartículas obtenidas después de la evaporación de los disolventes orgánicos bajo presión reducida. Así, la eficacia de encapsulación de moléculas poco solubles en agua es extremadamente baja en el caso de no usar co-disolventes. Aunque el uso de co-disolventes PEG y aminoácidos aumenta la eficacia de encapsulación de compuestos poco solubles en agua (por ejemplo, paclitaxel), el rendimiento del procedimiento de fabricación de las nanopartículas se reduce drásticamente.

Las microesferas de Gantrez® MS, preparadas por las técnicas de doble emulsión, mostraron una baja eficacia de encapsulación de moléculas insolubles en agua (alrededor del 30% en el caso de triclosán). Además, se demostró una rápida liberación del triclosán (alrededor del 100% en la primera hora en PBS), que indicó la baja estabilidad de los microsistemas de Gantrez® MS y la rápida liberación del fármaco y/o la degradación de los microsistemas [9]. Además, sistemas particulares basados en Gantrez® MS mostraron un hinchamiento rápido en tampón fosfato isotónico (pH 7,0) (vida media de hinchamiento de alrededor de 10 minutos) y cortos tiempos de retención en la mucosa del esófago porcino [10].

Por otro lado, un aspecto muy importante para la producción de nanopartículas es la complejidad de la producción industrial y los procesos de ampliación a escala. Varias técnicas han sido desarrolladas para la preparación de nanopartículas para el transporte de fármacos, tales como la emulsificación o técnicas de evaporación del disolvente, que implican el uso de disolventes orgánicos tóxicos (por ejemplo, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, acetona, etc.), y dispositivos complejos especiales como homogeneizadores. La implementación de dichas técnicas en la producción a gran escala sigue siendo un reto, ya que requiere pasos definidos, que incluyen la viabilidad de procesos, la optimización de la formulación, la optimización de procesos, la ampliación a escala y la validación con el fin de desarrollar productos de calidad y proporcionar un enfoque racional para las etapas de producción incluyendo la concentración del fármaco y la concentración de polímero, las operaciones de proceso, tamaño de partícula, la estabilidad del fármaco o la eficacia de captura.

Aunque se conocen un gran número de sistemas de nanopartículas para el transporte de productos de interés basados en el uso de los copolímeros de PVM/MA, hay algunos inconvenientes que están aún sin resolver y que limitan sus aplicaciones.

Por tanto, es necesario seguir desarrollando los sistemas de nanopartículas para el transporte de productos de interés que sean capaces de resolver todos o algunos de los inconvenientes mencionados anteriormente relacionados con los sistemas de nanopartículas basados en los copolímeros de PVM/MA, por ejemplo, baja estabilidad a largo plazo en un medio acuoso, el uso de reticulantes para mejorar la estabilidad en medios acuosos, la baja eficacia de encapsulación de los compuestos hidrofílicos, el uso de co-disolventes o agentes complejantes para mejorar la eficacia de encapsulación de compuestos hidrofóbicos, un procedimiento de producción costoso y complejo que requiere el uso de disolventes orgánicos tóxicos o técnicas complicadas. Ventajosamente, estos sistemas de nanopartículas para el transporte de productos de interés deberían tener, además de alta capacidad de bioadhesión a la mucosa, alta estabilidad a largo plazo en medios acuosos y alta eficiencia de encapsulación de productos de interés, incluyendo los aceites, así como compuestos pequeños o grandes, hidrofílicos o hidrofóbicos, y/o deberían ser producidos por procedimientos más simples, respetuosos con el medio ambiente. Estos objetivos pueden ser alcanzados mediante las nanopartículas proporcionadas por la presente invención.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que la mezcla de un disolvente aceptado para el uso farmacéutico o cosmético como el etanol o un poliol (por ejemplo, el propilenglicol) que contiene un semiéster de alquilo (C_1 - C_4) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), con un medio acuoso, opcionalmente en presencia de un excipiente, permite la formación espontánea de nanopartículas con un tamaño muy pequeño y homogéneo (alrededor de 130 nm) y alto rendimiento de las nanopartículas (cerca del 98%). Este procedimiento permite obtener nanopartículas con alta eficiencia de encapsulación tanto de moléculas hidrofílicas grandes como pequeñas (BSA y rodamina B), así como de moléculas hidrofóbicas (ketoconazol, minoxidil y triclosán) sin la necesidad de usar disolventes orgánicos adicionales (por ejemplo, acetona, diclorometano o acetato de etilo), co-disolventes (por ejemplo, CD o PEG) o tensioactivos que son aplicados habitualmente para obtener nanosistemas. Además, este método de fabricación de las nanopartículas también permite la formación de nanopartículas auto-ensambladas *in situ* (SANP) en un fluido corporal una vez que la solución del copolímero que contiene un producto

de interés (POI) se mezcla con dicho fluido y, en consecuencia, las nanopartículas cargadas con POI pueden formarse espontáneamente *in situ* en contacto con el fluido corporal (un medio acuoso).

La simplicidad del procedimiento de fabricación de nanopartículas a base de semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA reduce el coste de la ampliación a escala industrial debido a la simplicidad para obtener estos nanosistemas sin el uso de ningún aparato especial. Además, evitar el uso de la acetona como disolvente, los procesos de reticulación química y los procesos de secado es una ventaja importante en la fabricación de estos sistemas en comparación con otras nanopartículas de PVM/MA (por ejemplo, nanopartículas a base de Gantrez® AN).

Las nanopartículas resultantes a base de semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA han demostrado una estabilidad a largo plazo (baja tasa de degradación) superior a la de las nanopartículas basadas en Gantrez® AN, en 3 meses, sin ningún cambio en el tamaño promedio, bajo condiciones diferentes en un medio acuoso. Esto puede permitir la comercialización directa de las suspensiones acuosas de las nanopartículas basadas en semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA sin la necesidad de usar reticulantes tóxicos, liofilización u otras técnicas de secado. Además, estas nanopartículas pueden ser fácilmente incorporadas en muchas formas de dosificación, tales como soluciones, suspensiones, geles y formas semisólidas o sólidas que son ampliamente utilizadas en la industria cosmética y farmacéutica.

Además, las nanopartículas a base de semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA demostraron una mayor afinidad adhesiva en un modelo de superficie de mucosa bucal y lingual porcina a la observada en otras nanopartículas a base del copolímero de Gantrez® AN, que garantiza una mejora efectiva de la liberación controlada de un producto de interés.

Sorprendentemente, los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA, así como las nanopartículas basadas en semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA tienen un efecto de co-disolvente sobre compuestos poco solubles en agua que da lugar a una mejora de la eficacia de encapsulación de los fármacos hidrofóbicos (ketoconazol, minoxidil o triclosán) que se han utilizado en estos estudios. Así, dichas nanopartículas basadas en semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA garantizan una alta eficacia para encapsular tanto moléculas hidrofílicas como, especialmente, moléculas hidrofóbicas, sin la necesidad de la utilización de co-disolventes o agentes complejantes.

En resumen, las nanopartículas basadas en semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA muestran, entre otras, las siguientes propiedades: (i) alta afinidad adhesiva a las superficies de mucosas; (ii) alta estabilidad a largo plazo (tasa de degradación), tanto en medios acuosos como hidroalcohólicos; (iii) una alta eficacia para encapsular moléculas hidrofílicas y, en especial, moléculas hidrofóbicas sin la necesidad de co-disolventes o agentes complejantes, y (iv) alta facilidad para ser incorporadas en muchas formas de dosificación, por ejemplo, sólidos, líquidos o semisólidos, tales como suspensiones, geles, etc. Además, ventajosamente, dichas nanopartículas pueden ser fácilmente producidas a pequeña y gran escala sin el uso de disolventes orgánicos tóxicos o técnicas complejas. Todas las propiedades mencionadas anteriormente favorecen el uso de dichas nanopartículas en diferentes campos, como en los campos agrícola, alimentario, etc., especialmente, en los campos cosmético y farmacéutico, como sistemas de transporte de liberación controlada a diferentes superficies, incluyendo, entre otras, cabello, piel, etc., o su administración por, entre otras vías, vía bucal, nasal, oral, rectal, vaginal.

Por lo tanto, es un objetivo de esta invención, la producción y usos de las nanopartículas basadas en semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA.

Así, en un aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en:

a) una nanoesfera matricial, en donde dicha nanoesfera matricial comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA); y

b) una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa, en donde dicha nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA.

En una realización particular, dicha nanopartícula proporcionada por la presente invención, comprende además un producto de interés, por ejemplo, un producto de interés para la agricultura, industria cosmética, industria alimentaria o industria farmacéutica.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende al menos una nanopartícula proporcionada por la presente invención y un vehículo. En una realización particular, la composición es una composición cosmética o una composición farmacéutica adecuada para su administración por vía bucal, dental, nasal, ocular, oral, parenteral, rectal, tópica o vaginal.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende:

a) un componente seleccionado del grupo que consiste en:

- i. al menos una nanopartícula según la invención; y
- ii. una solución o suspensión que contiene un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) y un producto de interés en un medio, comprendiendo dicho medio un alcohol volátil miscible en agua y un medio acuoso, donde la cantidad de medio acuoso es menor que la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas; y

b) un vehículo

en donde dicho producto de interés se selecciona del grupo que consiste en ácido acetilsalicílico, péptido natriurético auricular alfa, arginina vasopresina, atropina, augmerosen, atorvastatina, Avastin® (bevacizumab), calcitoninas, gonadotropinas coriónicas, corticotropina, desmopresina, epibatidina, Erbitux® (cetuximab), exenatida, Herceptin® (trastuzumab), Humira® (adalimumab), Humulin®, ketoconazol, lanreótido, lutropina alfa, metoprolol, minoxidil, nesiritida, octreótido, paclitaxel, paracetamol, pegaptanib, hormona folículo estimulante recombinante, factores de crecimiento recombinantes, Remicade® (infliximab), Rituxan® (rituximab), semorelina, somatotropina, un derivado del taxano, taxol, acetato de teriparatida, tiotropina, triclosán, urofollitropina, Xolair® (omalizumab), actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, glucurónido de estradiol, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipino, fenotiazinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaempferol, levofloxacino, lidocaína, loperamida, losartán, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, nisoldipino, morfina, nelfinavir, nicardipino, nitrendipino, nifedipino, ondansetrón, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutina, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimús, sulfametizol, tacrolimús, tamoxifeno, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecán, triamcinolona, valspodar, verapamilo, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona, y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto comestible que comprende una nanopartícula proporcionada por esta invención.

En otro aspecto la invención se refiere a una nanopartícula según la presente invención, en donde el producto de interés es minoxidil, para su uso en el tratamiento de la pérdida del cabello, o en donde el producto de interés es triclosán o ketoconazol para su uso en el tratamiento de una infección bucal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanoesfera matricial que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), donde dicho procedimiento comprende poner en contacto una solución o suspensión orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA con un medio acuoso para formar dicha nanoesfera matricial.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanoesfera matricial que comprende un producto de interés, donde dicha nanoesfera matricial comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), donde dicho procedimiento comprende:

(a) poner en contacto una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso; o, alternativamente,

(b) poner en contacto una solución o suspensión alcohólica que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso; o, alternativamente,

(c) poner en contacto una solución o suspensión orgánica que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso, donde dicha solución o suspensión orgánica comprende un disolvente no-volátil miscible en agua.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un producto de interés, donde dicha nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), donde dicho procedimiento comprende poner en contacto una solución o suspensión que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA con un medio acuoso.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Fotografía de nanopartículas de Gantrez® ES 225 obtenidas por (A) microscopía electrónica de barrido (SEM) y (B) microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Figura 2. Estudio de estabilidad en correlación con la concentración de nanopartículas a temperatura ambiente (25°C) y la correspondiente microscopía electrónica de barrido (SEM). (A) y (C) muestran las fotografías de las nanopartículas de Gantrez® AN por SEM obtenidas antes y después de la hidrólisis, respectivamente; (B) fotografía de las nanopartículas de Gantrez® ES 225 por SEM a las 24 h.

Figura 3. Seguimiento de los tamaños para las nanopartículas de Gantrez® ES 225 y Gantrez® AN durante el estudio de estabilidad a temperatura ambiente (25°C).

Figura 4. Estudio de estabilidad comparativo entre las nanopartículas de Gantrez® ES 225 (GES NP) y Gantrez® AN (GAN NP) a diferentes temperaturas, concretamente, a (A) 4°C, (B) a temperatura ambiente (25°C), y (C) 37°C, utilizando agua bidestilada como medio de dispersión. La concentración de las nanopartículas utilizadas en esta prueba fue de 10 mg/ml.

Figura 5. Microscopía de fluorescencia para (A) una formulación control de aceite esencial de limón y (B) nanocápsulas Gantrez® ES 425 cargadas con aceite esencial de limón.

Figura 6. Microscopía de fluorescencia para las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con BSA-FITC.

Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (SEM) para (A) las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con ketoconazol (KTZ-nanopartículas de Gantrez® ES 425), y (B) los cristales del KTZ tratados por el mismo método aplicado para la formación de nanopartículas.

Figura 8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) para (A) los cristales de triclosán (TRI), (B) las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con triclosán (nanopartículas de TRI-Gantrez® ES 425), (C) aceite de TRI, y (D) microscopía de fluorescencia para la emulsión de TRI marcada con la sonda fluorescente lipofílica perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'3'-tetrametil-indocarbocianina.

Figura 9. Seguimiento del tamaño de las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con minoxidil (nanopartículas de MXD-Gantrez® ES 425). Las formulaciones investigadas fueron nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con 200 y 250 mg de MXD sin excipientes o con propilenglicol (PG), glicerol (G) o polietilenglicol 400 (PEG).

Figura 10. Visualización macroscópica y microscópica de la formulación de las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD sin excipientes o con propilenglicol (NPGES/MXD PG), glicerol (NPGES/MXD G) o polietilenglicol 400 (NPGES/MXD PEG) y para los productos comerciales (Lacovin® y Alopexy®) antes y después de secarse. Todas las formulaciones fueron utilizadas en concentraciones similares de MXD (2% p/v).

Figura 11. Microscopía electrónica de barrido (SEM) realizada para nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD sin excipientes (NPGES/MXD) o con excipientes, glicerol (NPGES/MXD G), propilenglicol (NPGES/MXD PG) y PEG 400 (NPGES/MXD PEG) y para los productos comerciales (Lacovin® y Alopexy®).

Figura 12. Caracterización microscópica de muestras de cabello. Estructura de cabello 20 veces aumentada, (A) microscopía de fluorescencia para el cabello normal sin nanopartículas de Gantrez® ES 425 marcadas con fluorescencia; y (B) microscopía de fluorescencia para el cabello normal de los grupos M1 (C) y M2 (D).

Figura 13. Microscopía electrónica de barrido (SEM) para el cabello normal incubado con nanopartículas de Gantrez® ES 425 para el grupo de cabello M1 (A, B) y el grupo de cabello M2 (C, D).

Figura 14. Ensayo de la cantidad adherida acumulativa de las formulaciones de nanopartículas tanto en el tejido de la mucosa bucal como de la lengua porcina a diferentes tiempos. Las formulaciones fueron: suspensión acuosa de nanopartículas de Gantrez® ES 225 marcadas con fluorescencia con rodamina B (NP GESR); suspensión acuosa de nanopartículas de Gantrez® AN marcadas con fluorescencia con rodamina B (NP GANR); nanopartículas de Gantrez® ES 225 marcadas con fluorescencia (GEL NPGESR) o de Gantrez® AN marcadas con fluorescencia (GEL NPGANR) resuspendidas en gel de hialuronato sódico (0,75% p/v). Cada valor se representó por la media (n=3; DE fue inferior al 20% de la media).

Figura 15. Visualización de tejido de secciones de mucosa bucal: (A) microscopía óptica de la mucosa bucal; (B) microscopía de fluorescencia de los tejidos bucales sin nanopartículas; (C) nanopartículas de Gantrez® ES 225 cargadas con rodamina B a 0,5 horas tras la administración; (D) nanopartículas de Gantrez® AN cargadas con rodamina B a 0,5 horas tras la administración; (E) nanopartículas de Gantrez® ES 225 cargadas con rodamina B a 2,5 horas tras la administración; y (F) nanopartículas de Gantrez® AN cargadas con rodamina B a 2,5 horas tras la administración.

Figura 16. Visualización de tejido de secciones cruzadas de la superficie dorsal de la lengua porcina con pequeñas proyecciones en forma de pelo llamadas “papilas filiformes”. (A) microscopía óptica de la superficie de la mucosa dorsal de la lengua; (B) nanopartículas de Gantrez® AN cargadas con rodamina B a 2,5 horas tras la administración; (C, D) nanopartículas de Gantrez® ES 225 cargadas con rodamina B a 2,5 horas tras la administración.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a unas nanopartículas a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA, a los métodos de producción de dichas nanopartículas, y a las aplicaciones de dichas nanopartículas.

Definiciones

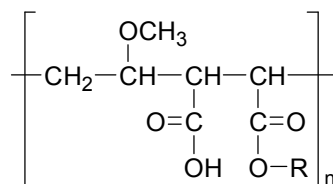
Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, el significado de algunos términos y expresiones usados en el contexto de la invención se exponen a continuación.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “alquilo (C₁-C₄)” se refiere a un radical derivado de un alcano lineal o ramificado de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, etc.

“Tamaño promedio” o “tamaño medio”, como se usa en el presente documento, se refiere al diámetro medio de una población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El tamaño promedio de estos sistemas se puede medir mediante procedimientos estándar conocidos por las personas expertas en la materia y que se describen, a modo de ilustración, en la parte experimental de los ejemplos descritos a continuación. El tamaño promedio de las partículas puede verse afectado principalmente por la cantidad y el peso molecular del copolímero, y por la naturaleza y la cantidad del producto de interés (si existe), presente en las nanopartículas de la invención (por lo general, cuanto mayor sea la cantidad o el peso molecular de dichos componentes, mayor es el tamaño promedio de las nanopartículas), y por algunos parámetros del procedimiento para la producción de dichas nanopartículas, tales como la velocidad de agitación, etc.

Un producto se dice que es de “grado alimenticio” cuando su uso en la alimentación humana o animal es seguro de acuerdo con el Codex Alimentarius de un país o de una organización, por ejemplo, la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas o la Organización Mundial de la Salud (OMS) y, en consecuencia, un producto de “grado alimenticio” es un producto no tóxico “adecuado para su uso en los alimentos”, y por lo tanto ambas expresiones son sinónimos y se utilizan indistintamente en esta descripción.

El término “semíéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA)”, como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de fórmula



donde R es un alquilo C₁-C₄, en la que se esterifica sólo uno de los dos grupos carboxilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “nanopartícula” se refiere a un sistema coloidal de una partícula polimérica sólida con un tamaño promedio inferior a 1 micrómetro (μm), por lo general entre 10 y 900 nanómetros (nm), preferiblemente entre 50 y 500 nm, más preferiblemente entre 100 y 400 nm, aún más preferiblemente entre 120 y 160 nm, aún más preferiblemente entre 120 y 160 nm aproximadamente, formado por polímeros naturales o sintéticos (en este caso, formado por polimerización de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA. Dependiendo, entre otros factores, de su método de fabricación, las nanopartículas pueden subdividirse en nanoesferas matriciales y nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa [11]. Las “nanoesferas matriciales” son formas matriciales formadas por una red polimérica tridimensional; cuando un nanoesfera se carga con un producto de interés, por ejemplo, un medicamento, dicho producto de interés puede ser físicamente y uniformemente dispersado en dicha red tridimensional. La matriz o red tridimensional de la nanoesfera matricial de la invención contiene un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de (PVM/MA). Las “nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa” son sistemas vesiculares formados por una cavidad interior (conocida como “núcleo”) que opcionalmente contiene el producto de interés y rodeado por una pared o membrana polimérica (conocida como “capa”), es decir, son sistemas nano-vesiculares que presentan una estructura típica de núcleo y capa en los que el producto de interés se limita a un depósito o dentro de una cavidad (“núcleo”) rodeada por una pared o membrana de polímero (“capa”). El experto en la técnica conoce que el núcleo de la nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa puede contener sólo excipientes, puede contener cualquier producto de interés según se define a continuación,

o puede contener ambos excipientes como productos de interés según se define a continuación. En ambos casos, debido a la gran superficie específica de estos sistemas, las moléculas del producto de interés pueden ser atrapadas o adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.

5 Tal como se utiliza en este documento, un “producto de interés” o “POI” se refiere a cualquier compuesto susceptible de ser utilizado en cualquier tipo de industria, como por ejemplo, en la industria agrícola, cosmética, alimentaria o farmacéutica. Prácticamente cualquier compuesto susceptible de ser utilizado en cualquier tipo de industria puede ser considerado como un POI de acuerdo con la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI de acuerdo con la presente invención incluyen compuestos grandes o pequeños, hidrosolubles o liposolubles, 10 hidrofílicos, hidrófobos o anfifílicos, orgánicos o inorgánicos, como lípidos, nucleósidos, nucleótidos, aceites, oligonucleótidos, péptidos, polinucleótidos, proteínas, compuestos químicos orgánicos pequeños, etc. El POI puede estar en cualquier forma o estado, por ejemplo, en estado líquido, semisólido o sólido, es decir, el POI podrá estar disuelto o dispersado en medios acuosos u orgánicos, formando así una solución o suspensión acuosa u orgánica, incluyendo soluciones o suspensiones oleosas, o, alternativamente, el POI puede estar no disuelto o no disperso, 15 como un producto sólido.

En una realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad agrícola, es decir, es susceptible de ser utilizado en la industria agrícola, por ejemplo, un producto fitosanitario para el control de plagas y patógenos, un agente promotor de crecimiento de las plantas, por ejemplo, herbicidas (por ejemplo, glifosato, etc.), insecticidas (por ejemplo, lambda-cialotrina, etc.), fungicidas (por ejemplo, mancozeb), etc.

En otra realización particular, el POI es un compuesto con actividad cosmética, es decir, una sustancia utilizada para mejorar el aspecto o el olor del cuerpo humano o animal. Los cosméticos incluyen cremas de cuidado de la piel, lociones, polvos, perfumes, barras de labios, pintauñas y esmalte de uñas de los pies, maquillaje de ojos y cara, 25 toallitas, productos para permanente, lentes de contacto de color, coloraciones de cabello, lacas y geles para el cabello, desodorantes, desinfectantes de manos, productos para bebés, aceites de baño, espumas de baño, sales de baño, mantecas corporales y muchos otros tipos de productos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI empleados en la industria cosmética incluyen productos anti-edad (por ejemplo, los retinoides), productos anti-acné (por ejemplo, eritromicina, peróxido de benzilo, etc.), productos para el cuidado facial (por ejemplo, el cobre GHK en limpiadores faciales, etc.), pigmentos cosméticos (por ejemplo, los pigmentos de color que se utilizan en colorete, base de maquillaje, corrector, polvos, etc.), cosméticos (por ejemplo, Co-Q10, etc.), productos de cuidado personal (por ejemplo, liberación controlada por humedad de fragancia en desodorantes, etc.), productos de filtros solares/de protección solar (por ejemplo, bloqueantes de rayos UV), productos para la limpieza de dientes, pastas de dientes o enjuagues (por ejemplo, principios activos de liberación sostenida de triclosán/bactericidas, sabores, fragancias, anti-sequedad de boca, etc.), productos para el champú (por ejemplo, principios activos anti-caspa/humectantes, etc.), 35 perfumes (por ejemplo, partículas de fragancia, etc.), productos para el cabello (por ejemplo, fijadores, productos para dar volumen al peinado del cabello, etc.).

En otra realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad nutricional, es decir, susceptibles de ser utilizado en la industria alimentaria, por ejemplo, ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, monofosfato de tiamina, pirofosfato de tiamina, trifosfato de tiamina, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos, ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, las vitaminas de las familias A, D, E, K y sus derivados, fosfolípidos, carotenoides (por ejemplo, carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina, etc.), ácidos grasos, ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, DHA, EPA, etc.), aminoácidos (por ejemplo, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y valina), fitoesteres o fitoestanoles (por ejemplo, sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (quercetina, rutina, resveratrol, kaempferol, miricetina, isorhamnetina, etc.), etc.

En otra realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad terapéutica (es decir, una sustancia que, cuando se administra a un sujeto, interactúa con su receptor en el sitio de acción y ejerce un cierto efecto); este tipo de productos son adecuados para ser utilizados en la industria farmacéutica. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI que tienen actividad terapéutica incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos, proteínas o antígenos de origen bacteriano, fúngico o viral, receptores celulares, factores de coagulación, citoquinas, enzimas, eritropoyetinas, factores de crecimiento, hormonas, insulinas, interleucinas, interferones, ligandos, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ADN, ARN, etc.), agentes de transducción de señales, compuestos químicos orgánicos pequeños, toxinas, etc. En una realización particular, el POI incluye agentes analgésicos (narcóticos) (por ejemplo, codeína, morfina, etc.), agentes analgésicos (no narcóticos) (por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ácido flufenámico, etc.), agentes antialopecia (por ejemplo, finasterida, minoxidil, etc.), agentes antianginosos (por ejemplo, atenolol, nifedipino, etc.), agentes antibacterianos (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefaclor, ciprofloxacino, neomicina, tetraciclina, etc.), agentes antidepresivos (por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, etc.), agentes antifúngicos (por ejemplo, isoconazol, ketoconazol, etc.), agentes antihipertensivos (por ejemplo, benazepril, captopril, carvedilol, enalapril, losartán, minoxidil, etc.), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, ácido niflumico, celecoxib, ibuprofeno, etc.), agentes antineoplásicos (por ejemplo, alemtuzumab, cisplatino, docetaxel, trastuzumab, etc.), agentes antipiréticos (por ejemplo, paracetamol, indometacina, etc.), agentes antipsicóticos (por ejemplo, risperidona, etc.), agentes ansiolíticos (por ejemplo, alprazolam, lorazepam, etc.), 65 agentes broncodilatadores (por ejemplo, carbaterol, adrenalina, etc.), glucocorticoides (por ejemplo, budesonida,

prednisolona, etc.), agentes inmunosupresores (por ejemplo, alemtuzumab, tacrolímús, etc.), etc. En una realización particular adicional, dicho POI se selecciona del grupo que consiste en ácido acetilsalicílico, péptido natriurético auricular alfa, arginina vasopresina, atropina, augmerosen, atorvastatina, Avastin® (bevacizumab), calcitoninas, gonadotropinas coriónicas, corticotropina, desmopresina, epibatidina, Erbitux® (cetuximab), exenatida, Herceptin® (trastuzumab), Humira® (adalimumab), Humulin®, ketoconazol, lanreótido, lutropina alfa, metoprolol, minoxidil, nesiritida, octreótido, paclitaxel, paracetamol, pegaptanib, hormona folículo estimulante recombinante, factores de crecimiento recombinantes, Remicade® (infliximab), Rituxan® (rituximab), sernorelina, somatotropina, los derivados de los taxanos, taxol, acetato de teriparatida, tirotropina, triclosán, urofollitropina, Xolair® (omalizumab), etc. En otra realización, el POI se selecciona del grupo que consiste en actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, glucurónido de estradiol, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipino, fenotiazinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaempferol, levofloxacino, lidocaína, loperamida, losartán, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, nisoldipino, morfina, nelfinavir, nicardipino, nitrendipino, nifedipino, ondansetrón, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutina, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolímús, sulfametizol, tacrolímús, tamoxifeno, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecán, triamcinolona, valspodar, verapamilo, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona y mezclas de los mismos.

En otra realización particular, el POI es un excipiente, es decir, una sustancia inactiva que puede ser líquida, sólida o semisólida, usada como medio o vehículo para los principios activos de una composición. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI actuando como excipiente son parafina líquida o lípidos fundidos tales como cera, aceite de algodón, aceite de maíz, aceite vegetal hidrogenado, aceite de colza, aceite de coco, etc. Dichos POI son particularmente útiles en la producción de nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa, y pueden encontrarse en el núcleo de dichas nanocápsulas.

Un “disolvente volátil”, como se usa en el presente documento, es un líquido que se vaporiza/evapora fácilmente a temperatura ambiente, un disolvente volátil habitualmente tiene alta presión de vapor y un punto de ebullición más bajo en comparación con el agua. Del mismo modo, un “disolvente no volátil”, como se usa en el presente documento, se refiere a un líquido que no se evapora con facilidad o se evapora muy lentamente a temperatura ambiente (por ejemplo, PG, PEG400, glicerol); un disolvente no volátil por lo general tiene baja presión de vapor y un punto de ebullición más alto que el agua.

Un disolvente o líquido “miscible en agua”, es un disolvente o líquido que se disuelve completamente en agua y es difícil de separar del agua, por ejemplo, alcoholes, etc.

Nanopartículas de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula, en lo sucesivo denominada “nanopartícula de la invención”, seleccionada del grupo que consiste en:

a) una nanoesfera matricial que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA); y

b) una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA.

El término “nanopartícula” se ha definido previamente y se refiere a un sistema coloidal de una partícula polimérica sólida con un tamaño promedio inferior a 1 µm, por lo general entre 10 y 900 nm, preferiblemente entre 100 y 400 nm, más preferiblemente entre 120 y 160 nm, aún más preferiblemente en torno a 130-140 nm, formada, en este caso particular, por la polimerización de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA. El término “nanopartícula”, salvo indicación contraria, incluye nanoesferas matriciales y nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa. En ambos casos, debido a la gran superficie específica de estos sistemas, las moléculas del POI, si está presente, pueden ser atrapadas o adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.

En una realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanoesfera matricial que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA. En esta realización, el producto de interés puede ser atrapado o encapsulado en la nanoesfera o, alternativamente, el producto de interés puede ser adsorbido en la superficie de la nanoesfera.

En otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una estructura nano-vesicular de tipo núcleo y capa (nanocápsula), que comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA. La cavidad (núcleo o depósito) puede contener el POI en forma líquida, semisólida o sólida o como una dispersión molecular; este depósito puede ser lipofílico o hidrofóbico de acuerdo con el método de

preparación y las materias primas utilizadas. Esto es particularmente útil para transportar los POI en forma de un estado líquido, semisólido o sólido, por ejemplo, aceites, líquidos inmiscibles en agua, soluciones o suspensiones orgánicas, incluyendo soluciones o suspensiones oleosas, que comprenden un POI, soluciones o suspensiones acuosas que comprenden el POI, etc. De acuerdo con esta realización, el POI puede estar dentro de la nanocápsula o, alternativamente, puede ser adsorbido en la superficie de la nanocápsula.

En otra realización particular, la invención proporciona una combinación de al menos una nanoesfera matricial que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA, y, al menos una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA.

Los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA son productos conocidos o pueden ser producidos al abrir el anhídrido de un copolímero de PVM/MA en un alcohol adecuado, tal como un alcohol que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA incluyen los comercializados por el proveedor ISP bajo las marcas comerciales comunes Gantrez® ES, por ejemplo, Gantrez® ES 225 (éster monoetilico del copolímero de PVM/MA), Gantrez® ES 335I (éster isopropílico del copolímero de PVM/MA), y Gantrez® ES 425 (éster monobutílico del copolímero de PVM/MA). Los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA son insolubles en agua y pueden ser suministrados en soluciones alcohólicas, por ejemplo, en soluciones de etanol [50% (p/v)].

Los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA tienen la capacidad de adherirse a la superficie de las mucosas durante un largo tiempo, lo que ofrece un largo periodo de permanencia en el lugar de la aplicación y una prolongada liberación de fármaco.

Los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de copolímeros de PVM/MA son considerados como materiales no tóxicos según los resultados de algunos estudios de toxicidad a corto plazo por vía oral ($DL_{50} > 25,6$ g/kg para el éster monoetilico o monobutílico del copolímero de PVM/MA), así como en los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación y no son irritantes oculares o dérmicos. Tampoco son irritantes de la piel, ni sensibilizantes, o fotosensibilizadores cuando se someten a ensayo en voluntarios humanos. El éster monobutílico del copolímero de PVM/MA no fue genotóxico. El éster monoetilico y monobutílico del copolímero de PVM/MA son seguros en una forma neutralizada como ingredientes cosméticos en las prácticas actuales de uso. De hecho, los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de los copolímeros de PVM/MA se consideran como copolímeros de la lista de material GRAS, actúan como formadores de película y fijadores de pelo (Cosmetic Ingredient Review), y pueden ser usados en productos cosméticos y de cuidado personal comercializados en Europa de acuerdo con las disposiciones generales de la Directiva sobre Cosméticos de la Unión Europea. El éster monobutílico del copolímero de PVM/MA se utiliza en lacas de pelo en aerosol y de bomba, espumas para el peinado y lociones fijadoras, maquillaje de ojos, cara y piel, cremas y lociones.

En una realización particular, dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA es el éster monoetilico del copolímero de PVM/MA o el éster monobutílico del copolímero de PVM/MA.

El peso molecular de los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de PVM/MA puede variar dentro de un amplio intervalo; en una realización particular, el peso molecular de los semiésteres de alquilo (C_1-C_4) de PVM/MA está comprendido entre 10 y 300 kDa, preferiblemente entre 50 y 250 kDa, más preferiblemente entre 90 y 150 kDa. En una realización concreta, dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA es el éster monoetilico del copolímero de PVM/MA y tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 150 kDa. En otra realización particular, dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA es el éster monobutílico del copolímero de PVM/MA y tiene un peso molecular comprendido entre 90 y 150 kDa.

Debido a la gran superficie específica de las nanopartículas de la invención, las moléculas de un producto de interés pueden ser atrapadas o adsorbidas en la superficie de las nanopartículas. Así, las nanopartículas de la invención pueden incorporar de manera eficiente los productos de interés, tales como compuestos grandes o pequeños, hidrofóbicos o hidrofílicos, que tienen diferentes usos y aplicaciones, y, por lo tanto, pueden ser potencialmente utilizados para diferentes aplicaciones (por ejemplo, en composiciones farmacéuticas, cosméticas o agrícolas, en los productos alimenticios, etc.)

Así, en una realización particular, las nanopartículas de la invención comprenden además un producto de interés (POI); en este caso, la nanopartícula de la invención a veces se identifica en esta descripción como "nanopartícula cargada de la invención". La información relacionada con dicho POI se puede encontrar en la sección anterior ("Definición"). El experto en la materia entenderá que una nanopartícula cargada de la invención puede incorporar uno o varios productos de interés (POI) en la misma nanopartícula siempre que dichos POI no sean incompatibles entre sí.

En una realización particular, dicho producto de interés es ketoconazol, minoxidil o triclosán, y la nanopartícula de la invención es una nanoesfera matricial en donde el producto de interés es atrapado o encapsulado en el interior de la nanoesfera o, alternativamente, se adsorbe en la superficie de la nanoesfera.

En otra realización particular, dicho POI es un aceite esencial, como el aceite esencial de limón, y la nanopartícula de la invención es una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa donde el POI es atrapado o encapsulado en el interior de la nanoesfera o, alternativamente, es adsorbido en la superficie de la nanoesfera.

La relación de peso entre “copolímero”:POI, en donde “copolímero” significa el copolímero formado por polimerización del éster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA, en la nanopartícula cargada de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la relación copolímero:POI en peso en la nanopartícula cargada de la invención puede estar comprendida entre $1:10^{-6}$ y $1:10^6$, preferiblemente entre $1:10^{-3}$ y $1:10^3$, y más preferiblemente entre 1:0,03 y 1:0,5.

Procedimiento para la fabricación de las nanopartículas

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanoesfera matricial que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) (es decir, una realización particular de las nanopartículas de la invención), en lo sucesivo denominado “procedimiento [1] de la invención”, que comprende poner en contacto una solución o suspensión orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA con un medio acuoso para formar dichas nanoesferas matriciales. Este procedimiento [1] de la invención produce las nanopartículas “vacías” de la invención, es decir, las nanopartículas sin producto de interés (POI), en particular nanoesferas matriciales en donde la matriz comprende un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA.

El semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA es un producto conocido o se puede producir al abrir el anhídrido del copolímero de PVM/MA (por ejemplo, Gantrez® AN) en un alcohol. En una realización particular, el semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA es el éster monoetilico, o el éster monoisopropílico, o el éster butílico del copolímero de PVM/MA.

El disolvente orgánico puede ser cualquier disolvente orgánico adecuado en el que el semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA pueda ser total o parcialmente solubilizado, preferiblemente un disolvente orgánico farmacéutica o cosméticamente aceptable. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes orgánicos que pueden ser utilizados en el marco del procedimiento [1] de la invención, incluyen alcoholes y disolventes no volátiles miscibles en agua distintos a los alcoholes, y sus mezclas.

El término “alcohol”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto orgánico en el que se une un grupo hidroxilo funcional (-OH) a un átomo de carbono, por lo general enlazado con otros átomos de carbono o hidrógeno, e incluye alcoholes que tienen un solo grupo hidroxilo, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, etc., y alcoholes que contienen dos o más (varios) grupos hidroxilo, por ejemplo, el propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etc. Metanol, etanol e isopropanol son alcoholes volátiles, mientras que el PG y PEG son alcoholes no volátiles que pueden estar presentes en estado líquido (PG) o como un sólido en función del peso molecular (PM) del PEG (por ejemplo, PEG6000, PEG10000). Se pueden utilizar disolventes sólidos (por ejemplo, PEG6000, PEG10000, etc.), por ejemplo, para producir formas farmacéuticas sólidas para la administración de fármacos, tales como supositorios, por ejemplo, supositorios rectales que comprenden, por ejemplo, fármacos antipiréticos, o supositorios vaginales (óvulos) que comprenden, por ejemplo, agentes antifúngicos, entre otros, y las nanopartículas se formarán cuando la solución o suspensión que comprende el polímero se ponga en contacto con un fluido corporal, por ejemplo, el fluido vaginal.

En una realización particular, el disolvente orgánico es un alcohol volátil, como el etanol. En otra realización particular, el disolvente orgánico es un alcohol no volátil, como PG. En otra realización particular, el disolvente orgánico comprende una mezcla de dos o más alcoholes volátiles. En otra realización particular, el disolvente orgánico comprende una mezcla de dos o más alcoholes no volátiles. En otra realización particular, el disolvente orgánico comprende una mezcla de al menos un alcohol volátil y al menos un alcohol no volátil, por ejemplo, una mezcla de etanol y PG.

De modo alternativo, el disolvente orgánico puede ser un disolvente no volátil miscible en agua que no sea alcohol. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes no volátiles miscibles en agua que no sean alcoholes incluyen polioxiglicéridos, por ejemplo, polioxiglicéridos de caprilcaproílo, derivados de ácidos grasos, por ejemplo, sus derivados de PG o PEG, etc. El término “polioxiglicéridos de caprilcaproílo” se refiere a un tensioactivo derivado de lípido. Un ejemplo de polioxiglicérido de caprilcaproílo son los glicéridos caprílico/cáprico de PEG-8 comercializados como Labrasol® por Gattefosse. Los polioxiglicéridos de caprilcaproílo también se conocen como “macroglglicéridos de caprilcaproílo”.

La concentración de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en la solución o suspensión orgánica del copolímero puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la concentración del semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en dicha solución o suspensión orgánica del copolímero está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,1% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 1% y el 15% (p/v), aún más preferiblemente entre el 2% y el 10% (p/v); en una realización

concreta, la concentración del semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en la solución o suspensión orgánica del copolímero es de alrededor del 5% (p/v).

La solución o suspensión orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA puede prepararse por disolución o dispersión de dicho producto en el disolvente orgánico. En una realización particular, el disolvente orgánico es un alcohol, tal como un alcohol simple, por ejemplo, un alcohol simple volátil, por ejemplo, etanol, etc., o un poliol, por ejemplo, un poliol no volátil, por ejemplo, PG. En otra realización particular, el disolvente orgánico es un disolvente no volátil miscible en agua que no sea alcohol como un polioxiglicérido, por ejemplo, un macroglicérido de caprilcaproilo, o un derivado de ácido graso.

En una realización específica, el disolvente es un alcohol; por lo que si el semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA ya está en la forma de una solución concentrada alcohólica, una solución alcohólica diluida que contiene el semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en la concentración deseada puede ser preparada con sólo añadir la cantidad necesaria de alcohol a la solución concentrada con el fin de alcanzar la concentración deseada. Este es el caso, por ejemplo, de los productos comerciales Gantrez® ES 225 (éster monoetilico del copolímero de PVM/MA), Gantrez® ES 335I (éster isopropílico del copolímero de PVM/MA) y Gantrez® ES 425 (éster monobutílico del copolímero de PVM/MA) que se suministran normalmente como soluciones etanólicas de dichos ésteres en una concentración de 50% (p/v), por lo que, en consecuencia, para alcanzar la concentración deseada (por ejemplo, 5% (p/v)), la solución comercial puede ser diluida por la adición de la cantidad necesaria de etanol absoluto.

Según el procedimiento [1] de la invención, una solución o suspensión orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso, que actúa como un no disolvente del polímero miscible en agua, para formar las nanopartículas. En una realización particular, el medio acuoso comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. Este paso se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 100°C, preferiblemente entre 10°C y 40°C, más preferiblemente entre 15°C y 25°C. Posteriormente, si se desea, la suspensión de nanopartículas obtenidas se somete a un tratamiento adecuado para eliminar el disolvente orgánico. La eliminación del disolvente orgánico puede ser realizada por cualquier método convencional, dependiendo de la naturaleza del disolvente que se desea eliminar, conocido por el experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, evaporación, etc. En una realización particular, cuando el disolvente orgánico es el etanol, la suspensión de nanopartículas se evapora, preferiblemente bajo presión reducida usando un rotavapor, con el fin de eliminar dicho alcohol.

De modo alternativo, las nanopartículas, y en particular las nanoesferas matriciales, pueden ser producidas por la eliminación del disolvente de una solución o suspensión hidroalcohólica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA y un alcohol miscible en agua, preferiblemente un alcohol volátil miscible en agua, en donde la cantidad de agua es inferior a la cantidad de agua necesaria para formar las nanopartículas; en esta realización, una vez que una parte del alcohol se elimina, la formación de las nanopartículas se produce. Ensayos realizados por los inventores han demostrado que la aplicación tópica de una solución hidroalcohólica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA y etanol, en donde la cantidad de agua fue menor que la cantidad de agua necesaria para formar las nanopartículas, a la piel humana (alrededor de 37°C), daba lugar a la formación de las nanopartículas sobre la superficie después de la eliminación de una parte de etanol por evaporación, como se muestra por la transformación de la solución inicial transparente en una suspensión lechosa que era indicativa de la formación de las nanopartículas en la superficie de la piel.

Así, en una realización particular, el procedimiento [1] de la invención, comprende (i) poner en contacto una solución o suspensión orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA, en donde dicha solución o suspensión orgánica comprende un disolvente volátil miscible en agua, preferiblemente un alcohol volátil miscible en agua, con un medio acuoso, para dar lugar a una solución o suspensión hidro-orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA en donde la cantidad de medio acuoso es menor que la cantidad de medio acuoso necesaria para formar las nanopartículas, y (ii) la eliminación de al menos una parte de dicho disolvente para formar las nanoesferas matriciales que comprenden una matriz, en donde la matriz comprende un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA.

La cantidad de medio acuoso que es necesaria para formar las nanopartículas depende, entre otras cosas, de la concentración de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en la solución o suspensión hidro-orgánica que contiene dicho copolímero; sin embargo, en una realización particular, la relación entre el medio acuoso (agua):alcohol (etanol) está comprendida entre 0,01:1 (v/v) y 1000:1 (v/v), preferiblemente entre 0,5:1 (v/v) y 10:1 (v/v), más preferiblemente de alrededor de 2:1 (v/v). En una realización concreta, las nanopartículas se forman después de la adición de 10 ml de agua a una solución alcohólica que comprende un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en etanol al 5% (p/v) [por el contrario, si 5 ml de agua se añadieran a 10 ml de la misma solución alcohólica del copolímero, entonces no se formarían nanopartículas].

La solución o suspensión hidro-orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA en un medio, comprendiendo dicho medio un disolvente volátil miscible en agua, preferiblemente un alcohol volátil miscible en agua, y un medio acuoso, en donde la cantidad de medio acuoso es menor que la cantidad de medio

acuoso necesaria para formar las nanopartículas, constituye un aspecto adicional de la presente invención. Dicha solución o suspensión hidro-orgánica puede utilizarse para producir nanopartículas, principalmente nanoesferas matriciales en donde la matriz comprende un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA, después de la eliminación del disolvente. En una realización particular, el disolvente es un alcohol volátil miscible en agua, por ejemplo, etanol, y el medio acuoso comprende agua; en esta realización, la solución o suspensión hidro-orgánica resultante es especialmente útil para su aplicación tópica en la piel o el pelo de un sujeto en donde las nanopartículas se forman en la superficie de la piel o el cabello después de la evaporación de una parte del etanol.

De modo alternativo, dichas nanopartículas pueden ser producidas *in situ* sin necesidad de someter a la suspensión de nanopartículas obtenida a un tratamiento para eliminar el disolvente orgánico. Para tal objetivo, la solución o suspensión orgánica del copolímero, preferiblemente una solución o suspensión orgánica en donde el disolvente del copolímero es un disolvente no volátil miscible en agua (como alcohol no volátil miscible en agua, por ejemplo, PG, o un disolvente no volátil miscible en agua que no sea alcohol), que contiene el semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA se prepara mezclando dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA con dicho disolvente orgánico, y posteriormente mezclando dicha solución o suspensión orgánica que contiene el copolímero con un medio acuoso, como un medio que comprende agua, por ejemplo agua, preferiblemente agua bidestilada, o un fluido corporal, por ejemplo, el fluido gastrointestinal, etc., y, en consecuencia, las nanopartículas auto-ensambladas *in situ* (SANP) se forman directamente. En esta realización, no es necesario eliminar el disolvente debido a la cantidad mínima residual de disolvente no volátil miscible en agua en las SANP en comparación con el método de evaporación del disolvente. De modo ilustrativo, una solución de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, como Gantrez® ES (en donde Gantrez® ES se refiere a Gantrez® ES 225, ES Gantrez® ES 335I o Gantrez® ES 425), en PG al 5% (p/v) se puede preparar disolviendo 10 g de la solución etanólica comercial de Gantrez® ES (50% p/v) en 100 ml de PG; lo que significa que la solución del 5% de Gantrez® ES en PG contiene 5% (v/v) de etanol. En el momento en que las nanopartículas se forman, 1 ml de Gantrez® ES al 5% en la solución de PG se mezcla con 10 ml de agua, por lo tanto la concentración de etanol es 0,225% (v/v), es decir, una mínima concentración final de etanol en comparación con la concentración de etanol en la suspensión de nanopartículas obtenidas según el método de eliminación del disolvente previamente divulgado antes de la eliminación del etanol (por ejemplo, por evaporación), en donde la concentración de etanol puede ser aproximadamente de 66,66% (v/v). El bajo nivel de etanol en la formulación evita el uso de grandes cantidades de etanol con el fin de obtener la solución o suspensión del copolímero y por lo tanto se puede administrar por vía oral con intervalos de concentración aceptables de etanol (mejora la biodisponibilidad oral de fármacos) o a través de la mucosa bucal.

Según esta realización, si la solución o suspensión orgánica que contiene el copolímero es una solución o suspensión en donde el disolvente es un poliol no-volátil miscible en agua, por ejemplo, PG, y dicha solución o suspensión de poliol no volátil que contiene el semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA se administra como tal por una vía adecuada que permita el contacto de dicha solución o suspensión con un fluido corporal, por ejemplo, vía oral, parenteral, rectal, vaginal, o similares, a un sujeto (por ejemplo, un animal como un ser humano), acto seguido, las nanopartículas se forman *in situ* por el auto-ensamblaje de cadenas del semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA en contacto con dicho fluido corporal adecuado que comprende un medio acuoso.

La concentración del semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en la solución o suspensión orgánica (disolvente no volátil miscible en agua) que contiene dicho copolímero puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la concentración del copolímero formado por copolimerización del semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en dicha solución o suspensión orgánica del copolímero está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,1% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 1% y el 15% (p/v), aún más preferiblemente entre el 2% y el 10% (p/v); en una realización concreta, la concentración del semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en la solución orgánica del copolímero es de alrededor del 5% (p/v).

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanoesfera matricial que comprende un producto de interés (POI), donde dicha nanoesfera matricial comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) (es decir, una realización particular de las nanopartículas de la invención), en lo sucesivo denominado "procedimiento [2] de la invención", que comprende:

[A] poner en contacto una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende dicho POI y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso; o, alternativamente,

[B] poner en contacto una solución o suspensión alcohólica que comprende dicho POI y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso.

El procedimiento [2] de la invención produce nanopartículas "cargadas" de la invención, concretamente, nanoesferas matriciales cargadas con al menos un producto de interés (POI).

Según la opción [A] del procedimiento [2] de la invención, una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso. Esta opción [A] es particularmente útil cuando el POI es un compuesto hidrofílico o anfifílico (en este caso, el porcentaje de agua debe ser ajustado). Brevemente, una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA se pueden obtener por medios convencionales conocidos por expertos en la materia, por ejemplo, mediante el mezclado de una solución o suspensión alcohólica de dicho POI (que puede obtenerse mediante la disolución o suspensión del POI en un alcohol adecuado), o como alternativa, una solución o suspensión acuosa de dicho POI (que puede obtenerse mediante la disolución o suspensión del POI en un medio acuoso, por ejemplo, un medio que comprende agua, preferiblemente, agua), con una solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en condiciones adecuadas para obtener dicha solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas condiciones del procedimiento incluyen agitación, a temperatura ambiente, durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, de 1 a 30 minutos, por lo general, menos de 15 minutos, preferiblemente alrededor de 5 minutos.

Las particularidades del POI se han mencionado anteriormente en la sección "Definiciones". Las particularidades del semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención, así como los detalles de la solución alcohólica de un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA, por ejemplo, alcoholes, concentración, etc. En una realización particular, el alcohol presente en la solución alcohólica es el etanol o un poliol como el PG.

Según la opción [A] del procedimiento [2] de la invención, una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, que actúa como un no disolvente del polímero miscible en agua, para formar las nanopartículas cargadas con dicho POI ("nanopartículas cargadas con POI"). La razón de volumen entre el disolvente del copolímero (alcohol, por ejemplo, etanol) y el no disolvente (por ejemplo, agua) [disolvente:no disolvente] puede variar dentro de un amplio intervalo, normalmente entre 1:0,001 (v/v) y 1:5000 (v/v), preferiblemente entre 1:0,5 (v/v) y 1:1 (v/v). Sin embargo, si la solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso "en defecto", es decir, en donde la cantidad de agua es menor que la cantidad de agua necesaria para formar las nanopartículas, también es posible la formación de las nanopartículas cargadas con POI por la eliminación de al menos una parte del alcohol, como se mencionó anteriormente en relación con una realización particular del procedimiento [1] de la invención; en este caso, el alcohol debe ser, preferiblemente, un alcohol volátil miscible en agua, como, por ejemplo, el etanol. Esta realización puede ser útil para la preparación de composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas o cosméticas, para suministrar el POI a través de la aplicación tópica de las mismas.

Así, en una realización particular, el procedimiento [2] de la invención, comprende (i) poner en contacto una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA, en donde dicha solución o suspensión comprende un alcohol volátil miscible en agua, con un medio acuoso, para dar lugar a una solución o suspensión hidroalcohólica que contiene el semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA en donde la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar las nanopartículas, y (ii) la eliminación de al menos una porción de dicho alcohol con el fin de formar nanoesferas matriciales que comprenden una matriz, en donde la matriz comprende un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA.

La solución o suspensión hidroalcohólica que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA y un POI en un medio, comprendiendo dicho medio un alcohol volátil miscible en agua y un medio acuoso, donde la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar las nanopartículas, constituye un aspecto adicional de la presente invención. Dicha solución o suspensión hidro-orgánica puede utilizarse para producir nanopartículas cargadas con POI, principalmente nanoesferas matriciales en donde dicha matriz comprende un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA, después de la eliminación del alcohol. En una realización particular, el alcohol es etanol, y el medio acuoso comprende agua; en esta realización, la solución o suspensión hidroalcohólica resultante es especialmente útil para su aplicación tópica en la piel o el pelo de un sujeto en donde las nanopartículas se forman en la superficie de la piel o el cabello después de la evaporación de una parte del etanol.

El paso de poner en contacto dicha solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende dicho POI y dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA con el medio acuoso se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 100°C, preferiblemente, entre los 10°C y 40°C, y más preferiblemente entre 15°C y 25°C. Posteriormente, si es necesario, la suspensión de nanopartículas cargadas con POI obtenidas así se somete a un tratamiento adecuado para eliminar el alcohol con el fin de obtener una suspensión acuosa de nanopartículas cargadas con POI. La eliminación del alcohol se puede realizar por métodos convencionales conocidos por expertos en la materia como, por ejemplo, evaporación, etc.; en una realización particular, la suspensión de nanopartículas cargadas con POI se evapora, preferiblemente bajo presión reducida

usando un rotavapor, para eliminar el etanol.

Según la opción [B] del procedimiento [2] de la invención, una solución o suspensión alcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso. Esta opción [B] es particularmente útil cuando el POI es un compuesto hidrofóbico o anfifílico. Brevemente, una suspensión alcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA se obtiene mediante el mezclado de dicho POI con una solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en condiciones adecuadas para obtener dicha suspensión alcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas condiciones de operación incluyen agitación, a temperatura ambiente, durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, de 1 a 30 minutos.

Las particularidades del POI se han mencionado anteriormente en la sección "Definiciones". Las particularidades del semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención, así como las particularidades de la solución alcohólica de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, por ejemplo, alcoholes, concentración, etc. En una realización particular, el alcohol presente en la solución alcohólica es el etanol o un poliol como propilenglicol (PG).

Según la opción [B] del procedimiento [2] de la invención, una suspensión alcohólica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, que actúa como un no disolvente del polímero miscible en agua, para formar las nanopartículas cargadas con dicho POI ("nanopartículas cargadas con POI"). En una realización particular, el medio acuoso comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. La relación de volumen entre el disolvente del copolímero (alcohol, por ejemplo, etanol o PG) y el no disolvente (por ejemplo, agua) [disolvente:no disolvente] puede variar dentro de un amplio intervalo, por lo general entre 1:0,001 (v/v) y 1:5000 (v/v), preferiblemente entre 1:0,5 (v/v) y 1:1 (v/v). Este paso de poner en contacto dicha solución o suspensión alcohólica que comprende dicho POI y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA con el medio acuoso se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 100°C, preferiblemente, entre 10°C y 40°C, y más preferiblemente entre 15°C y 25°C. Posteriormente, si se desea, la suspensión de nanopartículas cargadas con POI obtenidas así se somete a un tratamiento adecuado para eliminar el alcohol con el fin de obtener una suspensión acuosa de nanopartículas cargadas con POI como se mencionó anteriormente en relación con la opción [A] del procedimiento [2] de la invención. Cuando el disolvente es PG no es necesaria su eliminación, ya que puede ser usado en humanos por vía oral.

De modo alternativo, debido a que el semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA puede formar nanopartículas auto-ensambladas *in situ* (SANP), la invención proporciona un procedimiento adicional para producir una nanoesfera matricial que comprende un producto de interés (POI), donde dicha nanoesfera matricial comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) (es decir, una realización particular de las nanopartículas de la invención), en lo sucesivo denominado "procedimiento [3] de la invención", que comprende poner en contacto una solución o suspensión orgánica que comprende dicho POI y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso, en donde dicha solución o suspensión orgánica comprende un disolvente no volátil miscible en agua.

El procedimiento [3] de la invención da lugar a nanopartículas "cargadas" de la invención, concretamente, nanoesferas matriciales auto-ensambladas *in situ* cargadas con al menos un POI.

Según el procedimiento [3] de la invención, una solución o suspensión orgánica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en un disolvente no-volátil miscible en agua se pone en contacto con un medio acuoso. Este procedimiento es particularmente útil cuando el POI es un compuesto hidrofóbico, hidrofílico o anfifílico. Brevemente, una solución o suspensión orgánica que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en un disolvente no-volátil miscible en agua se obtiene mediante el mezclado de una solución o suspensión de dicho POI (que puede obtenerse mediante la disolución o dispersión del POI en un disolvente no-volátil miscible en agua) con una solución o suspensión de dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en un disolvente no-volátil miscible en agua, en condiciones adecuadas para obtener dicha solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA en un disolvente no-volátil miscible en agua. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas condiciones del procedimiento incluyen agitación, a temperatura ambiente, durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, de 1 a 30 minutos, por lo general, menos de 15 minutos, preferiblemente alrededor de 5 minutos. A pesar de que los disolventes de dichas soluciones o suspensiones, la solución o suspensión del POI y la solución o suspensión del semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA, pueden ser diferentes, en la práctica, se prefiere que el disolvente de las dos soluciones o suspensiones sea el mismo; en una realización particular, dicho disolvente es un poliol como PG.

Las particularidades del POI se han mencionado anteriormente en la sección "Definiciones". Las particularidades del semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA se han mencionado anteriormente en relación con el

procedimiento [1] de la invención.

Como se mencionó anteriormente, el disolvente puede ser cualquier disolvente adecuado, como un disolvente no volátil miscible en agua, en el que el semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA puede estar total o parcialmente disuelto, preferiblemente un disolvente no volátil miscible en agua y farmacéutica o cosméticamente aceptable. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes no volátiles miscibles en agua que pueden ser utilizados en el marco del procedimiento [3] de la invención, incluyen alcoholes no volátiles miscibles en agua, por ejemplo, PG, PEG, etc., disolventes no volátiles miscibles en agua que no sean los alcoholes, como polioxiglicéridos, por ejemplo, polioxiglicéridos de caprilcaproílo (Labrasol®), derivados de ácidos grasos, por ejemplo, sus derivados de PG o PEG, etc., y cualquier mezcla de los mismos, por ejemplo, una mezcla de dos o más alcoholes no volátiles miscibles en agua, una mezcla de dos o más disolventes no volátiles miscibles en agua que no sean alcoholes, o una mezcla de al menos un alcohol no volátil miscible en agua y al menos un disolvente no volátil miscible en agua que no sea alcohol.

La concentración de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en la solución o suspensión que comprende dicho POI y dicho disolvente no volátil miscible en agua puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la concentración del semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en dicha solución o suspensión está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,1% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 1% y el 15% (p/v), aún más preferiblemente entre el 2% y el 10% (p/v); en una realización concreta, la concentración del semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en la solución o la suspensión orgánica del copolímero es de alrededor del 5% (p/v).

Según el procedimiento [3] de la invención, una solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en un disolvente no volátil miscible en agua se pone en contacto con un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, para formar las nanopartículas cargadas con dicho POI ("nanopartículas cargadas con POI") por auto-ensamblaje *in situ* de las cadenas de copolímero. En una realización particular, el medio acuoso comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. Este paso se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 100°C, preferiblemente, entre 10°C y 40°C, y más preferiblemente entre 15°C y 25°C.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un producto de interés (POI), donde dicha nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA (es decir, una realización particular de las nanopartículas de la invención), de aquí en adelante denominado "procedimiento [4] de la invención", que comprende poner en contacto una solución o suspensión que comprende dicho POI y dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA con un medio acuoso. En una realización particular, la solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA se pone en contacto con el medio acuoso en presencia de un tensioactivo.

El procedimiento [4] de la invención da lugar a nanopartículas "cargadas" de la invención, concretamente, nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa cargadas con al menos un POI. El POI puede estar dentro de la nanocápsula o adsorbido en la superficie de la capa de la nanocápsula. El POI puede estar en un estado líquido, semisólido o sólido. En una realización particular, dicho POI es un aceite. En otra realización particular, dicho POI se disuelve o dispersa en un disolvente inmiscible en agua. En otra realización particular, dicho POI es un fármaco o un producto cosmético en forma de solución o suspensión oleosa o en forma de una solución o dispersión en un disolvente inmiscible en agua.

Según el procedimiento [4] de la invención, una solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso en presencia de un tensioactivo. Este procedimiento es particularmente útil cuando el POI es un compuesto hidrofóbico, hidrofílico o anfifílico.

Brevemente, una solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA se obtiene mediante el mezclado de (i) un POI, (ii) un alcohol, y (iii) una solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en condiciones adecuadas para obtener dicha solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA.

El alcohol que se mezcla tanto con el POI como con la solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA, en una realización particular, puede ser el mismo o, preferiblemente, diferente del alcohol que constituye la solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho alcohol incluyen casi cualquier alcohol, preferiblemente, un alcohol farmacéutica o cosméticamente aceptable, por ejemplo, un alcohol simple como el etanol, etc., o un poliol, por ejemplo, PG, PEG, etc., o cualquier mezcla de alcoholes simples, polioles, o ambos al menos un alcohol simple y al menos un poliol. El uso de mezclas de alcoholes puede ser conveniente, dependiendo, entre otros factores, de la solubilidad del semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA en las mezclas de la fase líquida que comprende el POI (por ejemplo, un aceite, una solución o suspensión del POI en un disolvente inmiscible en agua, etc.) y el alcohol (o

mezcla de ellos). En una realización particular, el alcohol para ser mezclado tanto con el POI como con la solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA es el etanol, PG, etc., preferiblemente PG (cuando la fase líquida que comprende el POI es altamente soluble en PG), o una mezcla de etanol y PG, y el alcohol que constituye la solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA es un alcohol simple, como el etanol, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de las condiciones del procedimiento para obtener la solución o suspensión que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA incluyen agitación, a temperatura ambiente, durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, de 1 a 30 minutos, por lo general, menos de 15 minutos, preferiblemente alrededor de 5 minutos.

La relación POI:copolímero en peso, en donde "copolímero" se refiere a la solución o suspensión alcohólica del copolímero, puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, dicha relación POI:copolímero, en peso, está comprendida entre 0,001:1 y 100:1, preferiblemente entre 0,01:1 y 1:1, más preferiblemente entre 0,02:1 y 0,05:1.

Las particularidades del POI se han mencionado anteriormente en la sección "Definiciones"; sin embargo, en este caso, el POI debe estar en la forma de una solución o suspensión en un líquido inmiscible en agua. Así, en una realización particular, el POI es un aceite, por ejemplo, un aceite esencial. En otra realización particular, el POI se disuelve o dispersa en un disolvente inmiscible en agua, por ejemplo, en un aceite formando así una solución o suspensión oleosa, etc. Por lo tanto, prácticamente cualquier POI capaz de ser disuelto o dispersado en un líquido inmiscible en agua puede ser utilizado en el contexto del procedimiento [4] de la invención. En una realización concreta, dicho POI es un fármaco o un producto cosmético en forma de una solución o suspensión oleosa, o en forma de una solución o dispersión en un disolvente inmiscible en agua.

Las particularidades del semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención, así como los detalles de la solución alcohólica de un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de PVM/MA, por ejemplo, alcoholes, concentración, etc. En una realización particular, el alcohol presente en la solución alcohólica de dicho semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA es etanol y el alcohol para ser mezclado con el POI y con dicha solución etanólica del semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA es un poliol, preferiblemente PG.

Según el procedimiento [4] de la invención, una solución o suspensión inmiscible en agua que comprende un POI y un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero de PVM/MA, por ejemplo, una solución o suspensión oleosa, se pone en contacto con un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, no disolvente, opcionalmente en presencia de un tensioactivo, para formar las nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa cargadas con dicho POI ("nanocápsulas vesiculares de tipo núcleo y capa cargadas con POI"). En una realización particular, el medio acuoso comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. La razón en volumen de la (solución o suspensión alcohólica que comprende el POI y el copolímero):fase acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 1:500 y 1:1000 (v/v), preferiblemente entre 1:5 y 1:10.

Aunque no es necesario el uso de tensioactivos para la producción de las nanocápsulas de tipo núcleo y capa de la presente invención, en la práctica puede ser de interés el uso de un tensioactivo, por ejemplo, uno hidrofílico, hidrofóbico o sus mezclas, con el fin de obtener la HLB adecuada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de los tensioactivos que pueden ser utilizados en el contexto de la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos, por ejemplo, los polisorbatos (es decir, líquidos oleosos derivados de sorbitán pegilado esterificados con ácidos grasos, por ejemplo, ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, etc.; ésteres de sorbitán plano (no-PEGilado) con ácidos grasos suelen ser mencionados por el nombre de "Span"), derivado de polioxietileno de monolaurato de sorbitán (Tween® 20), derivado de polioxietileno de oleato de sorbitán (Tween® 80), etc., tensioactivos aniónicos, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), etc., copolímeros en bloque a base de óxido de etileno y óxido de propileno comercializado como Pluronic® de BASF, alcohol polivinílico (PVA), etc. En una realización particular, el tensioactivo es TPGS (alfa-tocoferol succinato esterificado con PEG1000). La cantidad de tensioactivo puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la concentración de tensioactivo está comprendida entre el 0,001% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,01% y el 10% (p/v), más preferiblemente entre el 0,05% y el 5% (p/v).

Además, la razón de volumen de (solución o suspensión alcohólica que comprende el POI y el copolímero):fase acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 1:500 y 1:1000 (v/v), preferiblemente entre 1:5 y 1:10.

Este paso se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 100°C, preferiblemente, entre 15°C y 50°C.

Si se desea, las nanopartículas de la invención, tanto las que se cargan con un POI (nanopartículas cargadas con POI) como las que no se cargan (nanopartículas "vacías"), pueden incorporar un antioxidante, por ejemplo, ácido ascórbico (vitamina C), etc., en su formulación con el fin de aumentar su estabilidad con respecto a la temperatura y

la oxidación. En este caso, dicho antioxidante podría ser co-encapsulado con el POI (cuando sea apropiado) o en el recubrimiento de las nanopartículas de la invención; para lo cual, dichos procedimientos [1] a [4] de la invención serán adaptados adecuadamente para incorporar el antioxidante en la formulación de las nanopartículas, por ejemplo, mediante la adición del antioxidante al medio acuoso utilizado para producir las nanopartículas.

Además, si se desea, dichos procedimientos [1], [2], [3] y [4] de la invención pueden incluir una etapa de secado para secar la suspensión que contiene las nanopartículas formadas así, con el fin de obtener las nanopartículas de la invención, es decir, tanto las nanopartículas cargadas con POI como las nanopartículas "vacías", en forma de polvo. Esta forma de presentación de dichas nanopartículas contribuye a su estabilidad y es además particularmente útil para su eventual aplicación en alimentos sólidos, tales como harina, pan, productos de pastelería, cereales, leche en polvo, etc., así como en composiciones y productos cosméticos y/o farmacéuticos.

Prácticamente cualquier técnica o método convencional adecuado para el secado de suspensiones que contienen nanopartículas puede ser utilizada para realizar esta etapa de secado; sin embargo, en una realización particular, el secado de la suspensión que contiene nanopartículas se lleva a cabo por medio del secado por pulverización o por liofilización. Este tratamiento se realiza generalmente mediante la adición de un agente de protección adecuado para dichas nanopartículas, como un sacárido, por ejemplo, lactosa, trehalosa, manitol, sacarosa, maltodextrina, glucosa, sorbitol, maltosa, etc., y mezclas de los mismos a la suspensión de las nanopartículas. Dicho agente de protección protege las nanopartículas de la invención frente a la degradación térmica, así como la oxidación durante el procedimiento de secado.

La razón "semíéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA:sacárido" en peso puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la relación "semíéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA:sacárido" en peso está comprendida entre 1 y 1000, preferiblemente alrededor de 1:1-5.

Del mismo modo, en una realización particular, la solución que contiene el sacárido podría contener además un agente antioxidante, como el ácido ascórbico (vitamina C), etc.; en este caso, la relación "semíéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA: sacárido: agente antioxidante", en peso podría ser de 1:0,01-1000:0,001-100, preferiblemente alrededor de 1:5:0,2.

Como se mencionó anteriormente, un experto en la materia entenderá que una nanopartícula cargada de la invención puede incorporar uno o más POI en la misma nanopartícula siempre que dichos POI no sean incompatibles entre sí. A tal fin, los procedimientos [1], [2], [3] y [4] serán adecuadamente modificados para incorporar los POI en la misma solución alcohólica (o aceite) que comprende el semíéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA o en la misma solución hidroalcohólica o suspensión que comprende el semíéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA o, alternativamente, en diferentes preparaciones.

Las nanopartículas de la invención obtenidas de acuerdo con los procedimientos [1], [2], [3] o [4] de la invención constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Aplicaciones

Las nanopartículas de la invención tienen un gran número de propiedades que las hacen potencialmente útiles en muchas industrias, por ejemplo, en las industrias farmacéutica, cosmética, agrícola o alimentaria, como un sistema para el transporte de productos de interés a diferentes superficies, por ejemplo, bucal, tracto gastrointestinal, cabello, nasal, oral, rectal, piel, vaginal, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas propiedades de las nanopartículas de la invención incluyen alta bioadhesión a la mucosa, alta estabilidad a largo plazo en un medio acuoso, alta eficiencia de encapsulación de productos de interés, tales como compuestos pequeños o grandes, hidrofílicos, hidrófobos o anfifílicos, alta eficacia de encapsulación de aceites, y/o mejora de la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención permiten la incorporación de un POI en una composición agrícola, cosmética, alimenticia o farmacéutica.

Las nanopartículas de la invención pueden presentarse en forma de suspensión, preferiblemente en un medio acuoso, o, alternativamente, pueden presentarse en forma de un polvo seco, manteniendo el POI en una condición estable y permitiendo su almacenamiento durante largos períodos de tiempo (en particular, para su incorporación en preparaciones de comida sólida).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición, en lo sucesivo "composición de la invención", que comprende al menos una nanopartícula de la invención y un vehículo aceptable en agricultura, cosmética o farmacéutica o un vehículo adecuado en alimentación.

En una realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula "vacía" de la invención, es decir, una nanopartícula de la invención sin un POI, tal como (i) una nanoesfera matricial que comprende una matriz, dicha

matriz comprende un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, (ii) una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, o (iii) una combinación de (i) y (ii).

En otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula “cargada” de la invención, es decir, una nanopartícula de la invención cargada con un POI, como (i) una nanoesfera matricial que comprende un POI y una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA, (ii) una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un POI en el núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, o (iii) una combinación de (i) y (ii). En una realización particular, dicho POI es un POI con actividad agrícola, cosmética, nutricional y/o terapéutica. Las particularidades de dicho producto de interés se han mencionado en la sección “Definiciones”.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición agrícola, para lo cual, dicha composición comprende una nanopartícula “cargada” de la invención que comprende un POI susceptible de ser utilizado en el ámbito agrícola, en el sentido más amplio, por ejemplo, un producto fitosanitario para el control de plagas y patógenos, un agente promotor del crecimiento vegetal, etc., por ejemplo, herbicidas (glifosato, etc.), insecticidas (por ejemplo, lambda-cialotrina, etc.), fungicidas (por ejemplo, mancozeb), etc., y un vehículo aceptable en agricultura que comprende uno o más excipientes adecuados para su aplicación; la composición agrícola puede ser formulada en forma de un gel, suspensión, etc., utilizando los vehículos conocidos por un experto en la materia.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición cosmética, para lo cual, dicha composición comprende nanopartículas “vacías” de la invención, por ejemplo, nanopartículas vacías para su uso en productos para el peinado del cabello como fijadores de pelo, para el peinado, etc., o nanopartículas “cargadas” de la invención que comprenden un POI con actividad cosmética o susceptible de ser utilizado con fines cosméticos, o sus mezclas, y un vehículo cosméticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por una vía adecuada, como, por ejemplo, por vía tópica; la composición cosmética puede ser formulada en forma de cremas para el cuidado de la piel, lociones, polvos, perfumes, barras de labios, pintauñas y esmalte de uñas de los pies, maquillaje de ojos y cara, toallitas, productos para permanente, lentes de contacto de color, coloraciones de cabello, lacas y geles para el cabello, desodorantes, desinfectantes de manos, productos para bebés, aceites de baño, espumas de baño, sales de baño, suspensiones, mantecas corporales y muchos otros tipos de productos. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones cosméticas, así como sobre la producción de dichas composiciones cosméticas se pueden encontrar en el libro “Manual de Cosmetología”, de Octavio Díez Sales, 1ª edición, 1998, Editorial Videocinco, SA. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI empleados en la industria cosmética incluyen los productos que ya se han mencionado en la sección “Definiciones”.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición alimenticia tal como una preparación de alimentos sólidos, líquidos o semi-sólidos, para lo cual, dicha composición comprende una nanopartícula “cargada” de la invención que comprende un POI que tiene actividad nutricional y un vehículo para su uso en los alimentos. Alternativamente, la composición de la invención puede ser incorporada en un producto comestible; por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un producto comestible que comprende una composición de la invención, concretamente, una composición que comprende una nanopartícula “cargada” de la invención, comprendiendo dicha nanopartícula un POI que tiene actividad nutricional y un vehículo para su uso en los alimentos. El producto comestible se puede encontrar en forma líquida, semisólida o sólida. Ejemplos ilustrativos de los productos comestibles que pueden ser enriquecidos con la composición de la invención incluyen leche y sus derivados (yogures, quesos, cuajadas, etc.), jugos, mermeladas, bollería y productos de pastelería, carnes fermentadas, salsas, etc. Del mismo modo, la composición de la invención puede estar incorporada en un producto alimenticio para animales, por ejemplo, en piensos.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica, para lo cual, dicha composición comprende una nanopartícula “cargada” de la invención que comprende un POI con actividad terapéutica o susceptibles de ser utilizada con fines terapéuticos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes o vehículos.

El POI que está en la nanopartícula “cargada” de la invención puede ser atrapado o encapsulado dentro de la nanopartícula (es decir, nanoesfera o nanocápsula) o, alternativamente, el producto de interés puede estar adsorbido en la superficie de la nanopartícula.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen composiciones de líquidos, sólidos o semisólidos.

Las composiciones farmacéuticas comprenderán excipientes adecuados para cada formulación y serán preparadas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los excipientes se elegirán de acuerdo con la forma de dosificación farmacéutica seleccionada. Una revisión de las diferentes formas de dosificación farmacéuticas de los fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, SA de Ediciones.

La proporción del POI incorporado en la nanopartícula “cargada” de la invención puede variar dentro de un amplio

intervalo; sin embargo, en una realización particular, la relación peso/peso de copolímero:POI está comprendida entre $1:10^{-6}$ y $1:10^6$, preferiblemente entre $1:10^{-3}$ y $1:10^3$, más preferiblemente entre 1:0,03 y 1:0,5. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso del POI incorporado.

La dosis de las nanopartículas “cargadas” de la invención para administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento con el POI puede variar dentro de un amplio intervalo y dependerá, entre otros factores, de la naturaleza del POI, su actividad o potencia, la cantidad de POI en cada nanopartícula, etc.; sólo con fines ilustrativos, la dosis de las nanopartículas “cargadas” para ser administradas a un sujeto puede estar comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, preferiblemente, entre 0,1 y 2 mg por kg de peso corporal.

En una realización particular, dicha composición farmacéutica se formula como una forma de dosificación farmacéutica adecuada para su administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía bucal, dental, nasal, ocular, oral, parenteral, rectal, tópica o vaginal. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas formas de dosificación farmacéuticas incluyen sólidos (por ejemplo, cápsulas de no gelatina y de gelatina blanda o dura, películas adhesivas, parches adhesivos dentales, supositorios, comprimidos, granulados, micropartículas, etc.), semisólidos (por ejemplo, cremas, geles, lociones, ungüentos, etc.), líquidos (por ejemplo, las suspensiones de soluciones, etc.). En una realización preferida, debido a las propiedades bioadhesivas de las nanopartículas de la invención, la composición farmacéutica está formulada en forma de una composición para su administración a través de una ruta de acceso a la mucosa.

En una realización concreta, la composición farmacéutica está formulada como una forma farmacéutica adecuada para su administración por vía rectal (supositorios) o por vía vaginal (óvulos); si se desea, en esta realización, las nanopartículas pueden formarse cuando la solución o suspensión que comprende el polímero contacta con un fluido corporal, por ejemplo, el fluido vaginal.

En otra realización particular, la composición farmacéutica se prepara en forma de polvo seco, por ejemplo, como un liofilizado, junto con un agente crioprotector, para ser reconstituido antes de su uso mediante el mezclado con el agente de reconstitución.

En una realización concreta, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

Componente	% En peso respecto al total
Semiéster de alquilo (C_1 - C_4) de un copolímero de PVM/MA	0,01 – 99,98
POI	0,01 – 99,98
Excipientes	0,01 – 15,00

Las nanopartículas “cargadas” de la invención, en particular, aquellas nanopartículas cargadas con un POI en donde dicho POI es un fármaco, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades. El fármaco será elegido en función de la enfermedad a tratar.

Puesto que las nanopartículas de la invención pueden formarse *in situ*, otro aspecto de la invención es una composición que comprende:

i. una solución o suspensión que contiene un semiéster de alquilo (C_1 - C_4) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) y un producto de interés en un medio, comprendiendo dicho medio un alcohol volátil miscible en agua y un medio acuoso, donde la cantidad de medio acuoso es menor que la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas; y

ii. un vehículo

La invención se describe a continuación por medio de varios ejemplos que ilustran la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen la producción de nanopartículas (nanoesferas matriciales y nanocápsulas de tipo núcleo y capa), basadas en un semiéster de alquilo (C_1 - C_4) de un copolímero de PVM/MA que pueden incorporar un producto de interés, por ejemplo, un aceite (por ejemplo, aceite esencial de limón), una proteína (por ejemplo, seroalbúmina bovina), o un fármaco (por ejemplo, ketoconazol, minoxidil o triclosán). Dichos ejemplos ponen de manifiesto que dichas nanopartículas poseen alta capacidad de bioadhesión a las mucosas, elevada estabilidad a largo plazo en medio acuoso, alta eficacia de encapsulación de productos de interés, tales como compuestos pequeños o grandes hidrofílicos, hidrófobos o anfifílicos, alta eficacia de encapsulación de aceites y que estas nanopartículas son capaces de mejorar la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos.

A continuación se describen los materiales utilizados para la producción de dichas nanopartículas.

Materiales

Como semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA, se utilizaron soluciones etanólicas de Gantrez® ES comercial; concretamente, soluciones etanólicas de Gantrez® ES (50% p/v) del éster monoetilico (Gantrez® ES 225) y del éster monobutílico (Gantrez® ES 425) del copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) y Gantrez® AN 119 [peso molecular (PM): 200.000 (g/mol)] fueron suministrados por International Specialty Products (ISP, España).

El quitosano ultra puro soluble en agua (PROTASAN UP CL 113, PM: 50.000-150.000 g/mol) fue suministrado por NovaMatrix (Noruega).

La albúmina sérica bovina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA), la sonda fluorescente lipofílica perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina y TPGS (alfa-tocoferol succinato esterificado con polietilenglicol 1000 [PEG 1000]) fueron proporcionados por Sigma (España).

El triclosán, minoxidil, ketoconazol y el aceite esencial de limón con grado de Farmacopea Europea fueron suministrados por Fagron (España).

El hialuronato sódico y los triglicéridos de cadena media (Miglyol® 812) fueron suministrados por Fagron (España).

Todos los reactivos químicos restantes incluyendo los excipientes fueron de grado analítico y suministrados por Sigma (España).

EJEMPLO 1

Preparación y caracterización de nanopartículas de Gantrez® ES

1.1 Preparación de nanopartículas de Gantrez® ES por el método de nanoprecipitación por desplazamiento del disolvente

Para la obtención de nanopartículas de Gantrez® ES, la solución etanólica del polímero (50% p/v) del éster monoetilico (Gantrez® ES 225) y del éster monobutílico (Gantrez® ES 425) del copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) se diluyó con etanol absoluto a una concentración del 5% (p/v). Tras esto, las nanopartículas se formaron mezclando 5 ml de la solución de polímero con 10 ml de agua bidestilada como polímero miscible no disolvente. La suspensión de nanopartículas resultante se evaporó a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol.

Por otra parte, se obtuvieron las nanopartículas de Gantrez® ES auto-ensambladas *in situ* (SANP) con bajo contenido final de etanol y sin necesidad de evaporación. Para este fin, una solución del polímero de poliol no volátil (propilenglicol) que contenía Gantrez® ES 425 5% (p/v) se preparó disolviendo 10 g de solución alcohólica de Gantrez® ES 425 (50% p/v solución etanólica) en 100 ml de propilenglicol, y posteriormente, 1 ml de la solución del propilenglicol - Gantrez® ES 425 (5% p/v) se mezcló con 10 ml de agua bidestilada para obtener las nanopartículas. Por último, la suspensión acuosa de nanopartículas aniónicas vacías de Gantrez® ES se recogió para su posterior caracterización.

Con el fin de obtener nanopartículas catiónicas de Gantrez® ES, 15 ml de la suspensión hidroalcohólica de nanopartículas de Gantrez® ES (mezcla de 5 ml de solución alcohólica (5% p/v) de Gantrez® ES 225 (o Gantrez® ES 425) y 10 ml de agua bidestilada) o 10 ml de nanopartículas de Gantrez® ES 425 obtenidas por la técnica de preparación *in situ* se incubaron con 15 ml de solución acuosa que contenía quitosano ultra puro soluble en agua (PROTASAN UP CL 113) a diferentes concentraciones de quitosano (1,25, 2,5 y 5 mg/ml). Después, la mezcla se dejó bajo agitación magnética durante 5 minutos a temperatura ambiente. La suspensión de nanopartículas resultante se evaporó a presión reducida y las nanopartículas de Gantrez® ES recubiertas con quitosano fueron recogidas para su posterior caracterización.

1.2 Caracterización de las nanopartículas vacías de Gantrez® ES

1.2.1. Tamaño, potencial zeta, rendimiento y morfología de las nanopartículas

El tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica y anemometría electroforética láser Doppler, respectivamente, utilizando un equipo de análisis Zetamaster (Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras se diluyeron con agua bidestilada y se midieron a 25°C con un ángulo de dispersión de 90°.

El rendimiento del procedimiento de preparación de las nanopartículas, que es el porcentaje de polímero transformado en nanopartículas, se determinó por gravimetría de las muestras liofilizadas según lo descrito previamente [12]. Para este propósito, las suspensiones acuosas de nanopartículas se centrifugaron dos veces a

27.000 x g durante 20 minutos (centrífuga de laboratorio Sigma, Rotor 3336, Biofuge Heraeus, Alemania) y fueron recogidas y liofilizadas en un liofilizador Genesis 12EL (Virtis, EE.UU.). El porcentaje de rendimiento de las nanopartículas (la cantidad de polímero transformado en nanopartículas) se calculó como la relación entre las muestras de nanopartículas liofilizadas secas y la cantidad inicial del polímero utilizado para preparar las formulaciones.

Las características morfológicas de las nanopartículas se visualizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio digital electrónico de barrido Zeiss DSM 940 (Oberkochen, Alemania) y por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio electrónico Libra Zeiss® 120 (Oberkochen, Alemania).

1.2.2 Resultados

La tabla 1 muestra las principales características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez® ES. En general, las nanopartículas aniónicas vacías de Gantrez® ES preparadas a partir de Gantrez® ES 225 (GES-NP1) y Gantrez® ES 425 (GES-NP2) mostraron un tamaño homogéneo que fue de alrededor de 140 nm (GES-NP1, GES-NP2 y GES-NP auto-ensambladas) y una carga superficial negativa de aproximadamente -60 mV. El porcentaje de rendimiento de las nanopartículas fue muy alto para todas las formulaciones (alrededor del 98%). Por otro lado, el recubrimiento con quitosano de las nanopartículas de Gantrez® ES aumentó significativamente el tamaño de las partículas siendo de alrededor de 200 nm en comparación con las no recubiertas ($p < 0,05$). Las nanopartículas recubiertas con quitosano (GES-NP-Q 1,25, GES-NP-Q 2,5 y GES-NP-Q 5) mostraron un tamaño homogéneo con una carga superficial positiva. Se comprobó que al aumentar la cantidad de quitosano unido a la superficie de las nanopartículas, tanto el tamaño de las partículas como la carga superficial positiva aumentó significativamente ($P < 0,05$).

Tabla 1

Características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez® ES.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento, ($\pm$ DE)
GES-NP1	137,08 (1,37)	0,115	-62,6 (0,92)	98,32 (1,21)
GES-NP2	145,03 (1,88)	0,213	-66,21 (1,03)	97,11 (3,3)
GES-NP auto-ensambladas	131,91 (2,54)	0,100	-55,11 (2,11)	97,13 (1,27)
GES-NP-Q 1,25	187,43 (4,22)*	0,118	+20,48 (1,81)*	97,11 (1,98)
GES-NP-Q 2,5	198,97 (5,32)*	0,121	+24,08 (1,81)*	99,80 (3,30)
GES-NP-Q 5	220,30 (8,15)*	0,143	+42,82 (0,62)*	97,99 (2,02)

GES-NP1: Nanopartículas de Gantrez® ES obtenidas a partir del polímero Gantrez® ES 225

GES-NP2: Nanopartículas de Gantrez® ES obtenidas a partir del polímero Gantrez® ES 425

GES-NP-Q: Nanopartículas de Gantrez® ES 225 recubiertas con diferentes cantidades de quitosano

^a La determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) se realizó por espectroscopía de correlación fotónica

^b Índice de polidispersión

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d Porcentaje de nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

* $P < 0,05$; Nanopartículas recubiertas de quitosano frente a nanopartículas control (GES-NP) (t de Student).

Las nanopartículas de Gantrez® ES resultaron ser esféricas y homogéneas cuando se examinan por SEM y TEM [Figuras 1A y 1B (GES-NP1)].

1.3 Estudio de estabilidad de las nanopartículas

1.3.1 Estudios de estabilidad a corto y largo plazo.

Con el fin de estudiar la tasa de degradación de las nanopartículas de Gantrez® ES en diferentes condiciones, se monitorizó la estabilidad mediante el ensayo por turbidimetría a 405 nm, según un estudio publicado previamente [13]. Para tal efecto, se llevó a cabo un estudio comparativo de la estabilidad a corto plazo entre las diferentes

concentraciones de suspensiones acuosas de nanopartículas de Gantrez® ES 225 (10 y 20 mg de nanopartículas/ml) y Gantrez® AN 119 a temperatura ambiente. Se utilizaron como referencia en este estudio nanopartículas de Gantrez® AN 119 no reticuladas [8] porque Gantrez® AN 119 (ISP, España) ha sido considerado como un polímero insoluble en agua.

Por otro lado, el estudio de estabilidad a largo plazo (aproximadamente durante 3 meses) de la suspensión acuosa nanopartículas de Gantrez® ES 225 y Gantrez® AN (10 mg/ml) se realizó a diferentes temperaturas (4°C, temperatura ambiente (18-22°C) y 37°C).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y los datos fueron representados como la media y la DE. El tamaño de las nanopartículas fue monitorizado durante el estudio, y, por último, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para investigar los cambios en la morfología de las formulaciones de nanopartículas en el estudio de estabilidad a corto plazo.

1.3.2 Resultados

La figura 2 muestra la tasa de degradación de las nanopartículas de Gantrez® ES 225 y Gantrez® AN durante 24 horas a temperatura ambiente (25°C) a dos concentraciones diferentes (10 y 20 mg/ml) y su correspondiente microscopía electrónica de barrido (SEM) para investigar los cambios en la morfología de las nanopartículas. En general, las nanopartículas de Gantrez® ES 225 demostraron una mayor estabilidad y una menor tasa de degradación en el medio acuoso en comparación con las nanopartículas de Gantrez® AN, independientemente de la concentración de polímero. Durante las primeras 5 horas, ambos tipos de nanopartículas demostraron una estabilidad similar. Sin embargo, las nanopartículas de Gantrez® AN comenzaron a mostrar descenso vertiginoso de su perfil de degradación después de las 5 horas y se encontraron totalmente degradadas a las 6-8 horas después de la incubación. El tiempo de retraso (es decir, el momento en que la turbidez empieza a disminuir) de las nanopartículas de Gantrez® AN fue de alrededor de 5 horas. Las imágenes de SEM de la figura 2 muestran las nanopartículas de Gantrez® AN totalmente degradadas y en la imagen C se observa únicamente una película polimérica. Por otro lado, el tamaño de las nanopartículas de Gantrez® AN aumentó significativamente de 200 a 400 nm durante las primeras 5 horas de incubación (figura 3). Después de eso, el tamaño de las nanopartículas no se pudo detectar ya que se produjo la hidrólisis de las nanopartículas de Gantrez® AN formando una solución de polímero libre de Gantrez® S (forma soluble en agua de Gantrez® AN).

En el caso del estudio de estabilidad a largo plazo (figura 4), se ha observado que las nanopartículas de Gantrez® ES mostraron mayor estabilidad a diferentes temperaturas, en comparación con las nanopartículas de Gantrez® AN. La tasa de degradación de las nanopartículas de Gantrez® AN aumenta al aumentar la temperatura y el tiempo de retraso de degradación estuvo en el intervalo de 2 a 24 horas de incubación. En el caso de las nanopartículas de Gantrez® ES, no se observó degradación a 4°C o a temperatura ambiente. Sin embargo, a 37°C, la estabilidad representada por el tiempo de retraso de degradación para nanopartículas de Gantrez® ES fue de aproximadamente 350-400 veces más largo que para nanopartículas de Gantrez® AN.

EJEMPLO 2

Preparación y caracterización de nanocápsulas de Gantrez® ES conteniendo aceites

2.1 Preparación de nanocápsulas de Gantrez® ES conteniendo aceites

Con el fin de preparar nanocápsulas de Gantrez® ES cargadas con un aceite líquido, se incorporó a nanocápsulas vesiculares poliméricas de Gantrez® ES aceite esencial de limón por el método de desplazamiento de disolvente. Para este fin, 0,5 ml de aceite esencial de limón (marcado con la sonda fluorescente lipofílica perclorato de 1,1'-diocetadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina), y 0,5 ml de propilenglicol se mezclaron con 10 ml de una solución etanólica de Gantrez® ES 425 con una concentración de polímero de 25 mg/ml. Después de esto, la solución del polímero y el aceite se vertió en 30 ml de una fase acuosa (medio) que contenía un tensioactivo, concretamente TPGS (succinato de d-alfa tocoferol-polietilenglicol 1000) al 1% (p/v). Las formulaciones control fueron preparadas mediante la adición de una solución etanólica del aceite esencial de limón sin el polímero Gantrez® ES 425. A continuación, la suspensión de nanocápsulas resultante se evaporó a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol. La suspensión acuosa final de nanocápsulas Gantrez® ES 425 cargadas de aceite esencial de limón fueron recogidas para su posterior caracterización.

2.2 Caracterización de las nanocápsulas de Gantrez® ES

El tamaño, potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de las nanocápsulas se determinaron como se describe en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación del aceite esencial de limón marcado con fluorescencia, 2 ml de aceite inmiscible en agua (Mygliol® 812) se añadieron a 0,5 ml de nanocápsulas de Gantrez® ES 425 para extraer el aceite libre mediante agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. La cantidad de aceite libre fue analizada por espectrofluorimetría con una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm (GeNios, TECAN, Groedig, Austria). Para tal fin, se realizaron rectas de

calibrado con soluciones estándar de aceite esencial de limón marcado con la sonda fluorescente lipofílica perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina en un intervalo de concentraciones desde 0,05 hasta 2,5 µg/ml ($r = 0,996$). Por último, las formulaciones fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia (Olympus modelo CH40, Olympus, España).

2.3 Resultados

La tabla 2 describe las principales características físico-químicas de las nanocápsulas Gantrez® ES 425 cargadas con un aceite líquido (aceite de limón). Se observó que el aceite esencial de limón volátil se encapsuló de manera eficaz en las nanocápsulas de Gantrez® ES 425 y que el porcentaje de aceite encapsulado fue de aproximadamente 82%. El tamaño de las nanocápsulas de Gantrez® ES fue homogéneo (alrededor de 212 nm) mostrando un potencial zeta de carga negativa. Por otra parte, las formulaciones control preparadas sin el polímero Gantrez® ES mostraron una estabilidad menor y por lo tanto una separación de fases de la fase oleosa, y el tamaño de las gotas de aceite en la formulación control fue heterogéneo oscilando entre 5 y 15 µm. Esta característica fue observada por microscopía de fluorescencia de las dos formulaciones (figura 5).

Tabla 2

Características físico-químicas de las nanocápsulas de Gantrez® ES 425 cargadas con aceite esencial de limón y la formulación control.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta(mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento, ($\pm$ DE)	^e % de eficacia de encapsulación del aceite de limón
GES-NC	212,31 (3,11)	0,206	-65,11 (1,05)	93,12 (1,45)	82,7 (3,77)
Emulsión oleosa	1352,30 (100,47)*	0,667	-23,61 (1,72)	-	1,11 (0,19)

GES-NC: Nanocápsulas de Gantrez® ES 425 marcadas con fluorescencia cargadas con aceite esencial de limón.

Emulsión oleosa: Formulación sin el uso de polímero Gantrez® ES 425 (control negativo).

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d El porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

^e % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de aceite de limón encapsulado en nanopartículas de Gantrez® ES 425 en relación con la cantidad inicial de aceite de limón utilizado.

* P < 0,05 Nanopartículas de Gantrez® ES cargadas frente a la formulación control (emulsión oleosa) (t de Student).

EJEMPLO 3

Preparación y caracterización de nanopartículas de Gantrez® ES mediante secado por pulverización.

Para este fin, 50 ml de una solución etanólica de Gantrez® ES 425 (50 mg/ml) se mezclaron con 100 ml de agua destilada para formar las nanopartículas de Gantrez® ES. Se añadieron diferentes tensioactivos a la suspensión hidroalcohólica de nanopartículas como el dodecilsulfato de sodio (SDS) (100 mg), Pluronic® F68 [copolímero de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno] (100 mg) o Tween® 80 [polioxietileno (20) de monooleato de sorbitán] (7,5 mg). Por último, 7,5 g de manitol se añadieron como excipiente. Para obtener un polvo seco de las nanopartículas de Gantrez® ES, la suspensión se secó por pulverización mediante un Mini Spray Dryer Büchi B191 (Büchi Labortechnik AG, Suiza) bajo las siguientes condiciones:

temperatura de entrada: 90°C,

temperatura de salida: 60°C,

flujo: 600 l/h, y

aspirador al 90% de la capacidad máxima.

Durante el procedimiento la suspensión de nanopartículas se mantuvo bajo agitación moderada. El polvo recuperado fue almacenado en viales de vidrio cerrados a temperatura ambiente para su posterior caracterización como en el ejemplo 1.

La tabla 3 describe las principales propiedades físico-químicas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 obtenidas después de secado por pulverización de la suspensión de nanopartículas de Gantrez® ES 425 con diferentes excipientes. El rendimiento del procedimiento de secado por pulverización se calculó como la diferencia entre el peso del polvo seco obtenido del aparato de secado por pulverización (*spray dryer*) y el peso teórico inicial de los componentes añadidos. El polvo seco de las nanopartículas obtenidas del secado por pulverización se dispersó fácilmente en agua y los tamaños obtenidos fueron homogéneos con unos índices de polidispersión aceptables (0,2-0,3). El tamaño de las nanopartículas obtenidas después de la suspensión de la muestra en agua bidestilada fue de alrededor de 230 nm con una carga superficial negativa. El rendimiento del procedimiento de secado por aspersión o pulverización fue de alrededor del 80% del sólido seco teórico inicialmente utilizado.

Tabla 3

Características físico-químicas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 obtenidas mediante secado por pulverización.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento del procedimiento, ($\pm$ DE)
GES-NP	231,27 (3,11)	0,263	-62,71 (0,64)	76,36 (3,45)
GES-NP-SDS	216,03 (1,56)	0,213	-74,01 (0,60)	77,93 (5,55)
GES-NP-T	235,23 (2,20)*	0,311	-78,02 (0,72)*	81,05 (2,89)
GES-NP-P	230,06 (4,82)*	0,338	-64,31 (0,59)	88,12 (4,11)

GES-NP: Nanopartículas de Gantrez® ES obtenidas a partir de Gantrez® ES 425.

GES-NP-SDS: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 conteniendo SDS.

GES-NP-T: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 conteniendo Tween® 80.

GES-NP-P: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 conteniendo Pluronic® F68.

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

* P <0,05 Nanopartículas por secado por pulverización con excipientes (GES-NP-SDS, GES-NP-T y GES-NP-P) frente a nanopartículas control (GES-NP) (t de Student).

EJEMPLO 4

Encapsulación de albúmina sérica bovina como modelo de molécula grande en nanopartículas de Gantrez® ES

4.1 Encapsulación de BSA en nanopartículas de Gantrez® ES

Una proteína marcada con fluorescencia se utilizó como un modelo de molécula grande para ser incorporada en nanopartículas de Gantrez® ES. Con este fin, se utilizaron diferentes cantidades de albúmina sérica bovina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) (0,5, 1 y 2,5 mg/250 mg de Gantrez® ES 425). La proteína se disolvió en 1 ml de agua destilada y luego se añadió a 5 ml de una solución etanólica de Gantrez® ES 425 (50 mg/ml). La solución se dejó bajo agitación magnética durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se añadieron 9 ml de agua destilada para formar las nanopartículas. La suspensión de nanopartículas resultante se evaporó a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol. La suspensión acuosa final de las nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con FITC-BSA fue recogida para su posterior caracterización.

4.2 Caracterización de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con FITC-BSA

El tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas se determinaron como se describe en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación de FITC-BSA en las nanopartículas de Gantrez® ES, las suspensiones de nanopartículas se centrifugaron a 27.000 x g durante 20 minutos. Después, la cantidad de FITC-BSA libre fue analizada en los sobrenadantes y la cantidad de proteína encapsulada se calculó a partir de la cantidad inicial de proteína utilizada. A tal fin, las curvas de calibración fueron preparadas con soluciones estándar FITC-BSA en un intervalo de concentración de 1 a 50 µg/ml ($r = 0,996$). El ensayo se realizó por espectrofluorimetría a 485 nm (longitud de onda de excitación) y 535 nm (longitud de onda de emisión) (GeNios, TECAN, Austria). Las nanopartículas recién preparadas que contenían FITC-BSA se depositaron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma, España) y se visualizan por microscopía de fluorescencia (Olympus modelo CH40, Olympus, España).

4.3 Resultados

La tabla 4 describe las principales características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con FITC-BSA. Se observó que la encapsulación de FITC-BSA en nanopartículas de Gantrez® ES produjo un aumento significativo en el tamaño de las nanopartículas, pero no afectó a la carga superficial de las nanopartículas. La eficacia de encapsulación fue de aproximadamente 96%, lo que indica la alta capacidad de las nanopartículas de Gantrez® ES para incorporar grandes moléculas como las proteínas. La microscopía de fluorescencia de las nanopartículas de Gantrez® ES FITC-BSA corroboró la alta incorporación de FITC-BSA en el interior de la matriz polimérica de las nanopartículas (figura 6).

Tabla 4

Características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con FITC-BSA.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento, ($\pm$ DE)	^e % de eficacia de encapsulación de FITC-BSA, ($\pm$ DE)
GES-NP	122,31 (3,73)	0,109	-59,93 (3,45)	97,61 (1,21)	-
NP-BSA-0,5	133,30 (1,47)*	0,130	-60,51 (1,43)	98,52 (1,71)	96,11 (3,12)
NP- BSA-1	143,47 (1,59)*	0,132	-61,10 (0,86)	96,31 (2,13)	97,34 (1,69)
NP-BSA-2,5	176,67 (0,74)*	0,109	-62,21 (0,02)	97,79 (2,82)	95,88 (3,45)

GES-NP: Nanopartículas de Gantrez® ES obtenidas a partir de Gantrez® ES 425.

NP-BSA-0,5, NP-BSA-1 y NP-BSA-2.5: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con FITC-BSA, con diferentes cantidades de FITC-BSA.

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

^e % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de proteína encapsulada en nanopartículas de Gantrez® ES 425 en relación con la cantidad inicial utilizada.

* P < 0,05 Nanopartículas cargadas con FITC-BSA frente a nanopartículas control (GES-NP) (t de Student).

Este ejemplo muestra que se consiguió una alta eficacia de encapsulación (aproximadamente el 97%) de un gran compuesto hidrofílico (BSA).

EJEMPLO 5

Encapsulación de rodamina B como modelo de fármaco hidrofílico pequeño en nanopartículas de Gantrez® ES

Se prepararon nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con rodamina B mediante la adición de la molécula fluorescente hidrofílica (1 mg) pre-disuelta en 1 ml de agua bidestilada en 5 ml de una solución etanólica Gantrez® ES 425 (50 mg/ml). La solución se dejó bajo agitación magnética durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se añadieron 9 ml de agua destilada para formar las nanopartículas. La suspensión de nanopartículas resultante se evaporó a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol. La cantidad de RBITC

[isotiocianato de rodamina B] cargada en las nanopartículas se determinó por colorimetría a 540 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Finlandia). La cantidad de RBITC cargada se calculó como la diferencia entre la concentración inicial añadida y la concentración medida en los sobrenadantes después de la centrifugación. Se estudió la liberación *in vitro* de RBITC de las nanopartículas de acuerdo con un protocolo modificado descrito en otra parte [18]. Para tal efecto, 1 ml de la suspensión de nanopartículas se mezcló con 3 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) de pH 7,4 y se dejó bajo agitación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. En diferentes intervalos de tiempo, las nanopartículas fueron recogidas usando tubos de diálisis Vivaspin® 100.000 MWCO (Vivaspin, Alemania). Los dializados fueron analizados para cuantificar la cantidad de rodamina B liberada por colorimetría a 540 nm.

Las nanopartículas de Gantrez® ES mostraron una alta capacidad para asociar pequeñas moléculas hidrofílicas como rodamina B (tabla 5). La eficacia de encapsulación fue de 99% de la cantidad inicial de rodamina B añadida. Por otro lado, la encapsulación de rodamina B aumentó significativamente el tamaño de las nanopartículas (tabla 5) sin ningún tipo de influencia en la carga superficial de las nanopartículas.

Tabla 5

Características físico-químicas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con rodamina B.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6).

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento, ($\pm$ DE)	^e % de eficacia de encapsulación de rodamina B ($\pm$ DE)
GES-NP	129,11 (5,03)	0,119	-60,03 (1,33)	96,69 (2,91)	-
GESNP-RB	143,50 (1,81)*	0,145	-60,51 (3,43)	98,52 (1,71)	99,11 (1,18)

GES-NP: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 a partir de Gantrez® ES 425.

GESNP-RB: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con rodamina B.

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

^e % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de rodamina B encapsulada en nanopartículas de Gantrez® ES 425 en relación con la cantidad inicial utilizada.

* P < 0,05; Nanopartículas cargadas con rodamina B frente a las nanopartículas control (GES-NP) (t de Student).

EJEMPLO 6

Encapsulación de ketoconazol como modelo de fármaco antifúngico hidrofóbico en nanopartículas de Gantrez® ES para aplicaciones de liberación tópica y por vía mucosa

6.1 Producción de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con ketoconazol (KTZ)

Con el fin de investigar la capacidad de las nanopartículas de Gantrez® ES para atrapar moléculas hidrofóbicas, fue seleccionado el ketoconazol como molécula hidrofóbica insoluble en agua. El ketoconazol es un agente antifúngico imidazólico, con características de solubilidad muy baja en disolventes comunes como el agua y alcoholes. Se optimizó en primer lugar la selección de una apropiada relación de ketoconazol:polímero (p/p) que se necesita para disolver los cristales del fármaco y para obtener nanopartículas homogéneas libres de cristales de fármaco. A tal efecto, 200 mg de KTZ fueron resuspendidos en diferentes volúmenes de etanol absoluto (10, 15 y 20 ml) como solución control o en los mismos volúmenes de soluciones etanólicas de Gantrez® ES 425 (50 mg/ml). Las nanopartículas de Gantrez® ES se produjeron mediante la adición del correspondiente volumen de agua bidestilada (2:1 (v/v) agua/solución de polímero) para soluciones alcohólicas de Gantrez® ES que contienen KTZ. Al mismo tiempo, los volúmenes similares de agua bidestilada fueron añadidos a la solución etanólica de KTZ (control negativo sin el polímero para investigar el efecto solubilizante de Gantrez® ES). La suspensión de nanopartículas resultante o las soluciones hidroalcohólicas que contenían KTZ se evaporaron bajo presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol. Por último, las suspensiones acuosas de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con KTZ y la suspensión acuosa de KTZ sin el polímero se recogieron para su posterior caracterización y cuantificación de contenido de fármaco.

6.2 Caracterización de las nanopartículas KTZ

El tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de las nanopartículas se determinaron como se describe en el ejemplo 1. Se utilizó la fluorescencia y microscopía óptica para investigar la presencia de cristales en la suspensión de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con KTZ resultante. A tal efecto, las nanopartículas cargadas con KTZ y las de fármaco libre fueron tratadas del mismo modo y fueron visualizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, las nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con KTZ se dejaron a temperatura ambiente durante 2 meses, y después se investigó la morfología de las nanopartículas por SEM. La cantidad de fármaco encapsulado en las nanopartículas se determinó mediante espectrofotometría UV a 257 nm (Shimadzu 1203 UV-VIS). Con el fin de cuantificar la cantidad de KTZ en la suspensión de nanopartículas o en la suspensión de KTZ libre sin el polímero Gantrez® ES, todas las muestras de formulaciones recién preparadas se evaporaron a presión reducida para eliminar el etanol, y luego 1 ml de las muestras por triplicado, se centrifugó a 20.000 rpm durante 25 minutos. Después de eso, 0,5 ml de los sobrenadantes se diluyeron con metanol y se analizaron por espectrofotometría a 257 nm [14]. Al mismo tiempo, los precipitados de las nanopartículas que se dejaron a 37°C durante 2 días para evaporar el agua residual y luego las formulaciones que contenían KTZ se disolvieron en 1 ml de metanol y se analizaron a 257 nm. Las curvas de calibración se realizaron disolviendo 25 mg de KTZ en 100 ml de metanol. Los puntos de la curva de calibración (5-30 µg/ml) fueron preparados a partir de esta solución estándar.

6.3 Resultados

De los resultados que se muestran en la tabla 6, se puede concluir que las nanopartículas de Gantrez® ES muestran una alta capacidad para encapsular moléculas de fármacos insolubles en agua como ketoconazol. La eficacia de encapsulación fue de aproximadamente el 97% de la cantidad inicial de KTZ añadida. La cuantificación de los resultados obtenidos para la suspensión acuosa que contenía el precipitado cristalino obtenido después de la precipitación de KTZ de la solución alcohólica indicó que la solubilidad en agua de KTZ fue de alrededor de 11 µg/ml, que fue similar a los datos anteriormente publicados [15]. El aspecto del precipitado en esta muestra control negativa fue totalmente cristalino.

Por otra parte, la asociación de nanopartículas de Gantrez® ES con KTZ (NPGES-KTZ1, NPGES-KTZ2 y NPGES-KTZ3) disminuyó la carga superficial negativa en comparación con las de control (GES-NP). Los tamaños de las nanopartículas que contenían KTZ con diferentes concentraciones de polímero fueron homogéneos (alrededor de 200 nm), que indicó la ausencia de cristales de fármaco que eran de alrededor de 2-10 µm. Estos cristales de fármaco fueron observados únicamente tras el tratamiento de soluciones alcohólicas de KTZ tratadas del mismo modo que las soluciones alcohólicas de Gantrez® ES que contenían KTZ utilizadas para formar las nanopartículas. Este hecho fue observado después de la visualización de los cristales de KTZ y de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con KTZ por SEM) (figura 7). Resultados similares de SEM se obtuvieron a partir de las nanopartículas que se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 2 meses en los que no se observó crecimiento o la formación de cristales (figura 7C). Estos resultados indican que las nanopartículas de Gantrez® ES aumentan la solubilidad de fármacos hidrofóbicos, como KTZ

Tabla 6

Características físico-químicas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con ketoconazol.

Datos expresados como media ± DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), (±DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), (±DE)	^d % de rendimiento, (±DE)	^e % de eficacia de encapsulación de KTZ (±DE)
GES-NP	142,13 (2,07)	0,109	-58,43 (3,63)	98,19 (1,81)	-
NPGES-KTZ1	217,98 (4,00)*	0,211	-51,31 (0,64)	99,32 (2,13)	96,13 (1,67)
NPGES-KTZ2	205,12 (3,11)*	0,223	-49,12 (1,85)	99,32 (2,13)	97,66 (2,03)
NPGES-KTZ3	234,03 (2,50)*	0,190	-50,99 (2,09)	99,32 (2,13)	98,29 (1,00)

GES-NP: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 obtenidas a partir de Gantrez® ES 425.

NPGES-KTZ1: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con ketoconazol (200 mg de KTZ y 500 mg de Gantrez® ES 425).

NPGES-KTZ2: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con ketoconazol (200 mg de KTZ y 750 mg de Gantrez® ES 425).

NPGES-KTZ3: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con ketoconazol (200 mg de KTZ y 1000 mg de Gantrez® ES 425).

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler

^d Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

^e % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de KTZ encapsulado en nanopartículas de Gantrez® ES 425 en relación con la cantidad inicial utilizada.

* P < 0,05; Nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con ketoconazol frente a nanopartículas control (GES-NP) (t de Student).

EJEMPLO 7

Encapsulación del triclosán (TRI) como modelo de fármaco antimicrobiano hidrofóbico en nanopartículas de Gantrez® ES para la liberación tópica y por vía mucosa

7.1 Producción de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con triclosán

Con el fin de obtener nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con triclosán (TRI), se utilizaron diferentes cantidades de triclosán (TRI). Para tal fin, 12 y 20 mg de TRI fueron disueltos en 5 ml de solución etanólica de Gantrez® ES 425 de 40 mg/ml. Las nanopartículas de Gantrez® ES 425 fueron fabricadas mediante la adición de 10 ml de agua bidestilada. Después de esto, el disolvente orgánico (etanol) se evaporó a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza), y la concentración final total de TRI en estas nanopartículas fue de 0,12% o 2% (p/v). Las suspensiones acuosas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 que contienen TRI fueron recogidas para su posterior caracterización y cuantificación del contenido de fármaco.

Por otro lado, la técnica de auto-ensamblaje *in situ* fue utilizada para obtener nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con TRI con el fin de evitar el paso de la evaporación del etanol y obtener una suspensión de nanopartículas final con un bajo contenido de etanol. Con este fin, se preparó una solución del polímero (Gantrez® ES 425) a una concentración del 5% (p/v) en propilenglicol (PG) (solución de GES-PG). Después, se preparó una solución del TRI para disolver la correspondiente cantidad de TRI en una solución del polímero en propilenglicol (solución de TRI-PG). La solución GES-PG y la solución del TRI-PG se mezclaron (solución de GES-TRI-PG). Después de esto, las nanopartículas que contenían TRI fueron formadas por la adición de la solución de GES-TRI-PG al agua (10 ml).

Al mismo tiempo, la misma concentración de TRI fue utilizada en ambas técnicas (desplazamiento del disolvente y técnica de autoensamblaje *in situ*), pero sin utilizar Gantrez® ES 425, para su uso como control para verificar el efecto adyuvante en la solubilidad de las nanopartículas de Gantrez ES ® 425 en TRI.

7.2 Caracterización de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con triclosán.

El tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de la preparación de nanopartículas se determinaron como se describe en el ejemplo 1. Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fluorescencia para investigar la presencia de cristales en la suspensión resultante de nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas de TRI y en las formulaciones de control negativo (es decir, sin Gantrez® ES 425). La cantidad de fármaco encapsulado en las nanopartículas se midió mediante espectrofotometría UV a 280 nm [9] (Shimadzu 1203 UV-VIS). Con el fin de cuantificar la cantidad de TRI en la suspensión de nanopartículas, todas las muestras de nanopartículas de Gantrez® ES 425 se evaporaron a presión reducida para eliminar el etanol o directamente se analizaron en el caso de las formulaciones de TRI-PG. Para tal fin, 1 ml de las muestras (por triplicado) se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos. Después de esto, 0,5 ml de los sobrenadantes se diluyeron con metanol y se analizaron por espectrofotometría UV a 280 nm. Los puntos de la curva de calibración (10-40 µg/mL) fueron preparados a partir de esta solución estándar.

7.3 Resultados

Los resultados se muestran en la tabla 7. En vista de dichos resultados, se puede concluir que las nanopartículas de Gantrez® ES 425 mostraron una alta capacidad para encapsular una molécula farmacéutica insoluble en agua, como el triclosán (TRI). La eficacia de encapsulación fue de aproximadamente el 97% de la cantidad inicial de TRI añadida en el caso de las nanopartículas obtenidas por el método de desplazamiento de disolvente. Sin embargo, la eficacia de encapsulación se redujo significativamente (82%) en el caso de las nanopartículas obtenidas por la técnica de auto-ensamblaje. Los tamaños de las nanopartículas que contenían TRI a diferentes concentraciones fueron homogéneos (alrededor de 140 nm), lo que indicó la ausencia de cristales de fármaco que fueron de

alrededor de 50 a 200 μm (figura 8A). Esta característica fue observada después de la visualización de los cristales del TRI (formulaciones control negativo) y las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas de TRI mediante SEM (figura 8B). Estos resultados indicaron que las nanopartículas de Gantrez® ES 425 mejoraban la solubilidad acuosa de un fármaco hidrofóbico, como el TRI, debido a la ausencia de cristales de fármaco en la formulación de nanopartículas. Sorprendentemente, después de la adición de una determinada cantidad de agua (que fue mayor a la cantidad necesaria para obtener las nanopartículas) sobre la solución alcohólica de TRI sin Gantrez® ES 425, el TRI precipitó en forma de fase oleosa no cristalina y formó una emulsión con partículas oleosas de gran tamaño. Este aceite pudo ser visualizado tanto por SEM (figura 8C) como por microscopía de fluorescencia para la emulsión de TRI marcada con la sonda fluorescente lipofílica perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (figura 8D). La fase oleosa del TRI fue de alta densidad en agua y precipitó como una capa oleosa después de la coalescencia de las gotas de aceite.

Tabla 7

Características físico-químicas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con TRI.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento, ($\pm$ DE)	^e % de eficacia de encapsulación de TRI ($\pm$ DE)
GES-NP	132,11 (1,09)	0,119	-57,11 (2,34)	97,25 (2,71)	-
NPGES-TRI 0,12	142,21 (1,17)*	0,211	-59,21 (1,34)	99,32 (2,63)	96,13 (1,67)
NPGES-TRI 0,2	141,12 (2,50)*	0,200	-54,18 (1,23)	97,12 (2,05)	97,66 (2,03)
NPGES-TRI-PG 0,2	112,22 (3,07)	0,190	-56,99 (2,09)	95,32 (3,16)	82,29 (1,00) ⁺

GES-NP: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 a partir de Gantrez® ES 425.

NPGES-TRI 0,12: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con triclosán (concentración final de fármaco al 0,12% p/v en la suspensión de nanopartículas).

NPGES-TRI 0,2: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con triclosán (concentración final de fármaco al 0,2% p/v en la suspensión de nanopartículas).

NPGES-TRI-PG: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 auto ensambladas cargadas con triclosán.

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d Porcentaje de nanopartículas formado a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

^e % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de TRI encapsulado en nanopartículas de Gantrez® ES 425 en relación con la cantidad inicial utilizada.

* P < 0,05; Nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con triclosán frente a las nanopartículas control (GES-NP) (t de Student).

⁺ P < 0,05; Nanopartículas de NPGES-TRI-PG frente a NPGES-TRI (t de Student).

EJEMPLO 8

Encapsulación de minoxidil (MXD) como modelo de fármaco hidrofóbico en nanopartículas de Gantrez® ES para aplicaciones en la caída del cabello

8.1 Producción de nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con MXD

Las nanopartículas de Gantrez ES® cargadas con MXD fueron preparadas como se describió anteriormente para las nanopartículas de Gantrez ES® cargadas con KTZ (ejemplo 6). A tal efecto, 200 mg y 250 mg de MXD se

disolvieron en 5 ml de una solución etanólica o en 5 ml de una solución etanólica de Gantrez® ES 425 (50 mg/ml). Las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD fueron fabricadas por la adición de 10 ml de agua bidestilada a 5 ml de la solución alcohólica Gantrez® ES 425 bajo agitación magnética. La suspensión de nanopartículas resultante o la solución hidroalcohólica resultante que contenía MXD fueron evaporadas a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol. Por último, las suspensiones acuosas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 que contenían MXD fueron recogidas para su caracterización y cuantificación del contenido de fármaco. Por último, se añadieron diferentes excipientes usados como plastificantes compatibles con el polímero (Gantrez® ES) incluyendo propilenglicol, PEG400 (polietilenglicol con un peso molecular (PM) de 400 Da), y glicerol (10% (v/v)).

8.2 Caracterización de las nanopartículas de MXD

El tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de producción de las nanopartículas se determinaron como se describe en el ejemplo 1. Con el fin de estudiar la estabilidad física de las formulaciones, las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD se dejaron bajo condiciones agresivas y de alta temperatura (37°C durante 1 mes) para controlar el crecimiento de cristales o fenómenos de precipitación en los recipientes tanto de polipropileno como de vidrio. El tamaño y el aspecto general de las formulaciones se revisaron todos los días. Además, la caracterización macroscópica y microscópica (microscopía óptica y electrónica de barrido) se utilizó para investigar la apariencia y las propiedades físicas de películas secas de nanopartículas poliméricas que contenían MXD o formulaciones comerciales. Con este fin, 200 µl de la muestra [2% (p/v) de MXD] se aplicaron sobre una superficie de plástico y luego las muestras fueron secadas a 37°C para simular los fenómenos que ocurren después de su aplicación en el cuero cabelludo. Las formulaciones utilizadas fueron nanopartículas de Gantrez® ES 425 conteniendo MXD con diferentes excipientes (propilenglicol, PEG 400 y glicerol), una formulación comercial de MXD que contiene etanol, propilenglicol, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y agua (Lacovin® 2%), una formulación comercial que contiene gamma-ciclodextrinas, propilenglicol, etanol y agua (Alopexy® 2%). Estas formulaciones se aplicaron sobre una superficie seca y su aspecto fue monitorizado macroscópicamente y microscópicamente. Por último, la cantidad de fármaco encapsulado en las nanopartículas se analizó mediante espectrofotometría UV a 286 nm (Shimadzu 1203 UV-VIS). Con este fin, 1 ml de las muestras (por triplicado) de nanopartículas de Gantrez® ES 425 se centrifugó a 20.000 rpm durante 25 minutos. Después de esto, 0,5 ml de los sobrenadantes se diluyeron con etanol y se analizaron por espectrofotometría UV a 286 nm [16].

8.3 Resultados

En general, las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD con o sin excipientes mostraron un tamaño homogéneo pequeño de alrededor de 130 nm (PDI 0,1) con potencial zeta de carga negativa (-54 mV). La eficacia de encapsulación fue considerablemente alta en ambas formulaciones, una cargada con 200 mg de MXD y la otra cargada con 250 mg de MXD, y fue de alrededor del 70% de la cantidad inicial de MXD añadido (tabla 8). En el estudio de estabilidad física de las formulaciones, el seguimiento diario del tamaño y la visualización macroscópica durante 30 días bajo las condiciones físicas agresivas no indicaron ningún cambio en el tamaño (figura 9) o precipitados en los recipientes de polipropileno o vidrio. Estos resultados confirmaron que el MXD no-encapsulado quedaba disuelto en la suspensión acuosa de las nanopartículas.

Tabla 8

Características físico-químicas de nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD.

Datos expresados como media $\pm$ DE (n = 6)

	^a Tamaño (nm), ($\pm$ DE)	^b PDI	^c Potencial Zeta (mV), ($\pm$ DE)	^d % de rendimiento, ($\pm$ DE)	^e % de eficacia de encapsulación de MXD ($\pm$ DE)
NPGES-MXD 200	129,14 (1,00)	0,100	-54,67 (1,95)	96,35 (3,91)	72,57 (5,14)
NPGES-MXD 200 PG	130,21 (1,17)*	0,116	-56,11 (2,54)	95,32 (5,17)	68,51 (7,67)
NPGES-MXD 200 G	132 (3,60)*	0,113	-55,10 (3,24)	98,82 (2,09)	68,37(8,93)
NPGES-MXD 200 PEG	127 (2,60)	0,136	-55,99 (2,08)	95,09 (4,16)	63,92 (3,56)
NPGES-MXD 250	142,21 (1,17)*	0,192	-58,27 (2,94)	96,62 (1,55)	68,51 (5,57)
NPGES-MXD 250 G	139 (2,74)*	0,204	-59,14 (1,29)	98,18 (0,04)	68,37 (1,55)
NPGES-MXD 250 PG	145 (1,05)*	0,190	-57,99 (0,09)	95,52 (2,95)	63,92 (3,07)

NPGES MXD-200: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con minoxidil con 200 mg de MXD

NPGES MXD-250: Nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con minoxidil con 250 mg de MXD

PG, G y PEG: Excipientes añadidos a las formulaciones de nanopartículas, concretamente, propilenglicol (PG), glicerol (G) o polietilenglicol 400 (PEG).

^a Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) por espectroscopía de correlación fotónica.

^b Índice de polidispersión.

^c Determinación del potencial zeta mediante anemometría electroforética láser Doppler.

^d Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial del polímero utilizado.

^e % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de MXD encapsulado en nanopartículas de Gantrez® ES 425 en relación con la cantidad inicial utilizada.

* $P < 0,05$; GES-MXD 200 frente a GES-MXD 200 de nanopartículas control [nanopartículas de Gantrez® ES obtenidas a partir Gantrez® ES (GES-NP)] (t de Student).

Por otra parte, un ensayo de visualización macroscópica y microscópica se realizó para las nanopartículas de Gantrez® ES 425 que contenían MXD (2%) con diferentes excipientes, una formulación comercial de MDX que contenía etanol, propilenglicol y agua (Lacovin® 2%), y una formulación comercial que contenía gamma-ciclodextrinas, propilenglicol, etanol y agua (Alopexy® 2%). La figura 10 muestra los aspectos macroscópico y microscópico de las formulaciones aplicadas. En esta figura, el aspecto de las muestras antes de su secado era lechoso para las formulaciones de nanopartículas y transparente para los productos comerciales. Sin embargo, después de 2 horas de secado, se observó una película cristalina en los productos comerciales con una capa de cristales grandes y blancos visible. Por otra parte, las muestras de nanopartículas de Gantrez® ES 425 que contenían PEG 400 o propilenglicol mostraron una película adhesiva transparente sin ningún tipo de observación de precipitado cristalino grande. Las muestras que contienen nanopartículas de Gantrez® ES 425 con glicerol tenían un aspecto elegante ligeramente lechoso sin precipitado cristalino. Además, las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD sin excipientes mostraron un aspecto de una película seca delgada agrietada, pero sin ningún tipo de cristales visibles (figura 10). Además, las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD con diferentes excipientes (NPGES-MXDG, NPGES-MXD PEG y NPGES-MXD PG) no formaron una película seca después de 12 horas. Sin embargo, se observaron precipitados secos a las 2 horas para los productos comerciales y a las 4 horas para las de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD, sin excipientes. El examen microscópico confirmó los resultados macroscópicos, es decir, cristales grandes fueron observados en los productos comerciales Lacovin® y Alopexy® en las primeras 2 horas. Hubo diferencias significativas entre los aspectos de la película residual de las formulaciones de nanopartículas MXD. En este contexto, las nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD sin excipientes mostraron una película estriada de fácil rotura (NPGES-MXD). Este fenómeno no se observó para las películas secas de las nanopartículas de MXD que contenían excipientes como propilenglicol, glicerol o PEG. Además, no se observaron grandes cristales para ninguna de las películas secas que contenían las formulaciones de nanopartículas MXD.

La figura 11 muestra el SEM realizado para las formulaciones de nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con MXD y las formulaciones comerciales de MXD. Los datos obtenidos de esta figura correlacionaban exactamente y confirmaban los resultados mostrados en la figura 10. Para los productos comerciales (Lacovin® y Alopexy®), se observaron precipitados de grandes cristales. Por otra parte, no se observaron grandes cristales para las formulaciones de nanopartículas MXD (NPGES/MXD, NPGES/MXD G, NPGES/MXD PG y NPGES/MXD PEG). Tanto las formulaciones de nanopartículas de MXD sin excipientes (NPGES/MXD) como las nanopartículas de MXD con glicerol (NPGES/MXD G) mostraron la presencia de una película homogénea que contenía las nanopartículas con una distribución de tamaño homogéneo. Sorprendentemente, no se detectaron nanopartículas en las películas secas que contenían nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas de MXD con PG o PEG, que podía deberse a la solubilidad de los polímeros en estos excipientes después de la evaporación del agua. Es importante señalar que se observaron algunos precipitados grandes (capas de película polimérica) en la formulación que contenía PEG 400 lo que puede estar relacionado con la interacción de algunos grupos carboxílicos del polímero con el PEG. Son necesarias más investigaciones para identificar el tipo y la naturaleza de este precipitado. Por último, todas las películas tenían una apariencia elegante, con textura luminosa adhesiva pegajosa.

EJEMPLO 9

Afinidad bioadhesiva de nanopartículas de Gantrez® ES por el cabello

El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad adhesiva de nanopartículas de Gantrez® ES por el cabello.

Con este fin, se utilizaron nanopartículas de Gantrez® ES 425 marcadas con fluorescencia con rodamina B. Se prepararon nanopartículas de Gantrez® ES 425 cargadas con rodamina B mediante la adición de la molécula fluorescente hidrofílica (200 µg) previamente disuelta en 200 µl de agua bidestilada en 5 ml de una solución etanólica de Gantrez® ES 425 (50 mg/ml). La solución se dejó bajo agitación magnética durante 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación se agregaron 9,3 ml de agua destilada para formar las nanopartículas. La suspensión de nanopartículas resultante se evaporó a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol y la cantidad de rodamina B encapsulada en nanopartículas de Gantrez® ES 425 se analizó tal como se describe en el ejemplo 5. Según Wood, se añadieron 500 µl de glicerol a la suspensión acuosa de nanopartículas para conseguir 10 ml de volumen final de la suspensión de nanopartículas con una concentración de glicerol al 5% (v/v). Para el ensayo de adhesión, pelo negro normal de mujer (100 cm de longitud) se lavó con jabón y agua caliente (70°C) durante 5 minutos. Luego, el pelo fue cortado en porciones de 5 cm de largo y se dividió en dos grupos (M1 y M2). Las muestras de pelo se secaron con aire caliente con ayuda de un secador de pelo durante 5 minutos. Después de esto, el cabello seco se sumergió en nanopartículas de Gantrez® ES 425 marcadas con fluorescencia durante 30 segundos, y después se dejó secar a temperatura ambiente. Tras el secado, el pelo del grupo M1 se visualizó mediante fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM). La muestra de cabello del grupo M2 se lavó de nuevo con jabón y agua caliente (70°C) durante 5 minutos y luego se visualizó mediante fluorescencia y SEM tal como se ha descrito para el grupo M1. Con el fin de cuantificar la cantidad de nanopartículas adheridas al cabello en ambos grupos (M1 y M2), el pelo se digirió en NaOH 3 M para disolver las nanopartículas poliméricas que se habían adherido al pelo y para extraer la rodamina B. La cantidad de la fracción de nanopartículas adheridas al pelo fue analizada por espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Groedig, Austria) con el fin de estimar la fracción de nanopartículas adheridas al pelo. Los datos fueron representados por la fracción adherida de 1 mg de pelo o por cm² de superficie del cabello.

Se ha comprobado que la cantidad de la fracción adherida en las muestras de pelo fue de alrededor de 9,5 µg de nanopartículas/cm² de superficie del pelo para el grupo M1. En el otro grupo de muestras de cabello (M2), aunque se redujo la cantidad de fracción adherida de las nanopartículas debido al lavado del cabello, se encontraron nanopartículas todavía adheridas a la superficie del cabello (3,5 µg de nanopartículas/cm² de superficie del pelo). La fluorescencia y la SEM (figuras 12 y 13), confirmaron una afinidad adhesiva inicial alta de las nanopartículas de Gantrez® ES 425 a la superficie del cabello. Además, la película seca de las nanopartículas adheridas a la superficie del cabello en el grupo M1 resistió el lavado y las condiciones de alta temperatura y las nanopartículas se mantuvieron adheridas a la superficie del cabello tal como se ve en el grupo M2. Además, el aspecto del cabello que contenía la película de nanopartículas de Gantrez® ES 425 era elegante, transparente, brillante y no mostró ningún residuo negro después del secado.

EJEMPLO 10

Estudio de afinidad a la mucosa ex vivo de nanopartículas de Gantrez® ES en mucosa bucal porcina

10.1 Ensayo cuantitativo de bioadhesión

Con el fin de estudiar la capacidad de bioadhesión (bioadhesividad) y la afinidad por la mucosa de las nanopartículas de Gantrez® ES, se utilizaron mucosa bucal porcina y superficie dorsal de la lengua recién obtenidas. Con este fin, se obtuvieron cabezas de porcino de un matadero local y la mucosa bucal o la mucosa dorsal de la lengua se aislaron quirúrgicamente. El epitelio se limpió de los tejidos conectivos subyacentes con ayuda de un bisturí quirúrgico y se cortaron áreas circulares de 2 cm². Luego, las muestras de tejido fueron almacenadas en PBS a 4°C y se utilizaron en el plazo de 2 horas. El tejido se sujetó entre unas bridas planas de los compartimentos de las celdas de Franz y se depositaron diferentes muestras de las formulaciones de nanopartículas en el compartimiento dador. En este caso, las formulaciones de nanopartículas fueron de 500 µL de:

- (i) una suspensión acuosa de nanopartículas de Gantrez® ES 225 marcadas con fluorescencia con rodamina B preparadas como en el ejemplo 9, sin el uso de glicerol,
- (ii) una suspensión acuosa de nanopartículas de Gantrez® ES 225 AN marcadas con fluorescencia con rodamina B,
- (iii) nanopartículas de Gantrez® ES 225 marcadas con fluorescencia resuspendidas en gel de hialuronato de sodio (0,75% p/v), y
- (iv) nanopartículas de Gantrez® AN marcadas con fluorescencia resuspendidas en gel de hialuronato de sodio (0,75% p/v).

Para la aplicación de las muestras en la superficie de la mucosa, un lado del compartimiento dador (1 cm² del tejido) fue expuesto a 500 µl de suspensión acuosa de nanopartículas sólo durante 30 segundos con agitación turbulenta para simular las condiciones bucales de un enjuague bucal. Luego, las muestras se retiraron del compartimento y las

formulaciones fueron expuestas a 75 ml de fluido salival simulado [19] - [20] a 37°C durante 6 horas. En el caso de las aplicaciones del gel de hialuronato sódico, la cantidad equivalente de nanopartículas incorporadas en el gel de hialuronato se dejó en el compartimiento. Las muestras de tejido fueron retiradas a diferentes intervalos de tiempo y un área de 1 cm², que fue expuesto a la muestra durante el experimento, fue cortada y aislada. La cantidad de nanopartículas adheridas fue analizada tal como se ha descrito previamente [12]. Brevemente, cada segmento de la mucosa fue digerido con 2 ml de NaOH 3 M durante 24 h. Las muestras se diluyeron en 3 ml añadiendo NaOH 3 M, se agitó con vórtex durante 10 minutos y se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos. Por último, la cantidad de rodamina B fue cuantificada por espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Groedig, Austria) con el fin de estimar la fracción de nanopartículas adheridas a la mucosa. Las curvas patrón del estudio de bioadhesión fueron preparadas por adición de soluciones de rodamina B en NaOH 3 M (0,05-1 µg/ml) con tejido de control ($r > 0,996$).

10.2 Visualización del tejido por microscopía de fluorescencia

La distribución de las formulaciones de nanopartículas de Gantrez® ES 225 cargadas con rodamina B en la mucosa bucal y en la lengua fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia. A tal fin, se retiraron las muestras de la superficie de la mucosa expuesta a las diferentes formulaciones y se lavaron con PBS a las 2,5 horas después de la exposición. Entonces, la mucosa fue cortada en trozos pequeños con unos bisturís quirúrgicos y se trataron con un medio de procesamiento de tejido OCT (temperatura de corte óptima) (Sakura, Países Bajos) y congelados en nitrógeno líquido. Las muestras de tejido fueron cortadas en secciones longitudinales de 5 µm en un criostato (2800 Frigocut E, Reichert-Jung, Alemania), se adhirieron a los portaobjetos recubiertos previamente de poli-L-lisina (Sigma, España) y almacenados a -20°C antes de su visualización por microscopía de fluorescencia.

10.3 Resultados

La figura 14 representa la cantidad acumulada de la fracción adherida de formulación de nanopartículas (NP) por cm² de tejido (µg de NP/cm² de tejido) para los copolímeros Gantrez® ES 225 y Gantrez® AN tanto en la mucosa bucal porcina como en la mucosa dorsal de la lengua. En general, las nanopartículas de Gantrez® ES 225 (NP GESR) mostraron una mayor capacidad adhesiva que las nanopartículas de Gantrez® AN (NP GANR). Sin embargo, ambos tipos de nanopartículas mostraron una fuerza de adhesión inicial similar en el momento 0 (0 horas). A 1, 2,5, 4 y 6 horas, las fracciones adheridas acumuladas de las nanopartículas de Gantrez® ES 225, en ambos tipos de mucosa porcina, fueron aproximadamente 2-3 veces mayor que las fracciones adheridas acumuladas de las nanopartículas de Gantrez® AN ($P < 0,05$). En el caso de las formulaciones en gel que contenían las nanopartículas, se observó que el gel de hialuronato mejoraba la capacidad adhesiva inicial de las nanopartículas de Gantrez® ES 225 (GEL NPGESR) aproximadamente 2 veces más que la suspensión de nanopartículas de Gantrez® ES en el tiempo 0. Además, en 1, 2,5, 4 y 6 horas, se observó una mejora considerable de la capacidad bioadhesiva en el gel que contenía las nanopartículas de Gantrez® ES 225. Sorprendentemente, este fenómeno no se observó en el caso de las formulaciones en gel que contenían las nanopartículas de Gantrez® AN (GEL NPGANR), en donde no se encontraron diferencias significativas entre suspensiones acuosas (NP GANR) y el gel que contenía las nanopartículas de Gantrez® AN (GEL NPGANR).

La figura 15 muestra las imágenes de microscopía de fluorescencia de ambos tejidos de la mucosa bucal después de 0,5 y 2,5 h de la administración de las formulaciones de nanopartículas marcadas con fluorescencia. El tejido control (sin la formulación de nanopartículas) mostró una baja intensidad de fluorescencia en el tejido (figura 15B). Las nanopartículas de Gantrez® ES cargadas con rodamina B mostraron una alta intensidad de fluorescencia en la capa mucosa de la mucosa bucal a las 0,5 horas de la incubación del tejido con fluido salival (figura 15C), que fue similar a las 2,5 h (figura 15E). Por otro lado, la intensidad de fluorescencia en los tejidos de las nanopartículas de Gantrez® AN se redujo desde 0,5 hasta 2,5 horas después de la incubación que fue aproximadamente similar a la del control a las 2,5 horas después de la administración (figuras 15 D y 15F). Estos datos confirman que Gantrez® ES 225 tiene una mayor afinidad y mayor tiempo de residencia en la mucosa bucal que las nanopartículas de Gantrez® AN. Además, se observó que, en todos los casos, las nanopartículas no penetraban en el tejido sub-mucosa.

La figura 16 muestra las imágenes de microscopía de fluorescencia de la superficie de la mucosa dorsal de la lengua a las 2,5 h de la administración de formulaciones de nanopartículas marcadas fluorescentemente. En un tejido (mucosa dorsal de la lengua porcina), que es similar al tejido de la mucosa bucal, las nanopartículas de Gantrez® ES 225 (figuras 16C y 16D) mostraron una mayor afinidad y un mayor tiempo de residencia que las nanopartículas de Gantrez® AN (Figura 16 B).

Discusión general de los ejemplos 1-10

Los inventores han optimizado el método de evaporación del disolvente y la técnica de auto-ensamblaje *in situ* para la producción de nanopartículas bioadhesivas (nanoesferas matriciales o nanocápsulas de capa) fabricadas con un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA.

En este contexto, se ha encontrado, sorprendentemente, que la mezcla de un disolvente aceptado para el uso

farmacéutico o cosmético tal como el etanol o un poliol (por ejemplo, el propilenglicol) que contiene dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, con una solución acuosa, que contiene opcionalmente uno o más excipientes, permitió la formación espontánea de las nanopartículas con un tamaño pequeño muy homogéneo. En el caso del método de evaporación del disolvente, el tamaño promedio de las nanopartículas así obtenidas fue de

5 alrededor de 125-145 nm, típicamente alrededor de 130 a 135 nm, con un alto rendimiento de producción (alrededor del 98%).

Además, ha sido posible obtener nanopartículas auto-ensambladas *in situ* (SANP) a base de dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA. Esta técnica de auto-ensamblaje *in situ* permite la formación *in situ* de

10 las nanopartículas y la encapsulación de un producto de interés (POI) en dichas nanopartículas en el momento en que el semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA se pone en contacto con un medio acuoso, por ejemplo, agua, o un fluido corporal, tal como el fluido del tracto gastrointestinal.

La sencillez del procedimiento de la producción de las nanopartículas de la invención (basado en el uso de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA) reduce el costo a escala industrial debido a la

15 simplicidad para obtener dichos nanosistemas sin el uso de ningún aparato especial descrito para nanosistemas basados en otros derivados de PVM/MA, por ejemplo, copolímeros de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) (Gantrez® AN).

Una ventaja importante de las nanopartículas de la invención consiste en que la estabilidad a largo plazo (tasa de degradación) en medio acuoso de dichas nanopartículas de la invención es más alta que la de los nanosistemas de

20 Gantrez® AN (figura 2), es decir, las nanopartículas de la invención muestran una menor tasa de degradación que la de los nanosistemas de Gantrez® AN en un estudio de estabilidad a largo plazo en un medio acuoso.

Se han aplicado técnicas de emulsificación para obtener nanosistemas de Gantrez® AN que muestran estabilidad a corto plazo en los estudios de estabilidad de esos nanosistemas en medio acuoso debido a la hidrólisis de Gantrez®

25 AN a Gantrez® S. Del mismo modo, en un medio acuoso, estas nanopartículas se disuelven muy rápido. La estabilización de los nanosistemas de Gantrez® AN en medios acuosos requiere una modificación química con compuestos de poliaminas, agentes reticulantes tóxicos, tales como 1,3-diaminopropano (DP), o moléculas inmunogénicas tales como albúmina sérica bovina (BSA). La adición de DP solamente mejora débilmente la

30 estabilidad de las nanopartículas de Gantrez® AN en PBS obteniendo una velocidad de hidrólisis del 20% en 2 horas frente a un 40% para las nanopartículas de Gantrez® AN no reticuladas. Otras desventajas de la reticulación de las nanopartículas de PVM/MA incluyen el aumento significativo del tamaño medio de las nanopartículas y la drástica disminución de la capacidad bioadhesiva de los nanosistemas. Sin embargo, las nanopartículas de la invención no necesitan reticulación, y, en consecuencia, dichas nanopartículas pueden ser comercializadas en forma

35 de una suspensión acuosa, sin la necesidad de utilizar moléculas reticulantes tóxicas, liofilización u otras técnicas de secado. Además, pueden ser fácilmente incorporadas en muchas formas de dosificación (por ejemplo, líquidas, semisólidas o sólidas) que son ampliamente utilizadas en la industria cosmética y farmacéutica.

Las nanopartículas de la invención han demostrado una alta capacidad para encapsular los diferentes tipos de moléculas, tales como compuestos hidrofílicos grandes, por ejemplo, BSA (ejemplo 4) y compuestos hidrofílicos

40 pequeños, por ejemplo, rodamina B (ejemplo 5). Sin embargo, se han descrito algunas dificultades en relación con la capacidad de las nanopartículas de Gantrez® AN para la incorporación de fármacos hidrosolubles en la fase orgánica del polímero (una solución de Gantrez® AN en acetona). Como es conocido, los fármacos hidrosolubles no son solubles en acetona y pueden formar cristales de gran tamaño que puedan interferir con la formación de las

45 nanopartículas una vez se añade la solución hidroalcohólica para precipitar el Gantrez® AN en forma de nanosistemas. Por esa razón, el fármaco hidrosoluble, por ejemplo, 5-fluorouridina (FURD), pudo cargarse en nanopartículas de Gantrez® AN sólo mediante la incubación del fármaco con las nanopartículas previamente formadas y, en consecuencia, la eficiencia de encapsulación obtenida fue muy baja (alrededor del 13%).

Por otra parte, la producción de nanocápsulas vesiculares de núcleo y capa que contienen un aceite ha sido optimizada por la presente invención. Se encapsuló eficientemente aceite esencial de limón en las nanopartículas de

50 la invención (eficacia de encapsulación de alrededor del 82%) y el tamaño medio de las nanocápsulas proporcionadas por la invención, basadas en un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, fue homogéneo (alrededor de 212 nm) [ejemplo 2].

En relación con los compuestos que son poco solubles en agua, se necesitaron agentes complejantes tales como ciclodextrinas (CD), o solubilizantes incluyendo polietilenglicoles y aminoácidos (glicina), para encapsular fármacos

60 hidrofóbicos, tales como el paclitaxel, en nanopartículas de Gantrez® AN. De hecho, si los agentes complejantes o solubilizantes no se utilizan, la eficacia de encapsulación del compuesto hidrofóbico (lipófilo) fue menos del 1% de la cantidad inicial añadida. Otros tipos de copolímeros derivados de PVM/MA, por ejemplo, microesferas de Gantrez® MS elaboradas mediante técnicas de emulsión doble mostraron una baja eficacia de encapsulación de compuestos hidrofóbicos (alrededor del 30% de triclosán).

Sin embargo, según esta invención, es posible encapsular compuestos que son poco o parcialmente solubles en

65 agua, por ejemplo, los compuestos hidrofóbicos o lipofílicos, en las nanopartículas a base de un semiéster de alquilo

(C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA (invención), con alta eficiencia de encapsulación. Los Ejemplos 6, 7 y 8 ilustran la incorporación de fármacos hidrofóbicos, tales como ketoconazol (KTZ), triclosán (TRI) y minoxidil (MXD) en las nanopartículas a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención). Como se muestra en los ejemplos 6-8 mencionados, la eficacia de encapsulación del KTZ en dichas nanopartículas fue de alrededor del 97% de la cantidad inicial añadida (tabla 6), la eficacia de encapsulación del TRI fue de alrededor del 97% (tabla 7), y la eficacia de la encapsulación del MXD fue de alrededor del 72% (tabla 8). Además, se aplicó la técnica de auto-ensamblaje *in situ* para la producción *in situ* de nanopartículas auto-ensambladas (SANP) para encapsular TRI; se obtuvo una alta eficacia de encapsulación del triclosán en SANP basadas en un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA (invención) (alrededor del 82% - tabla 7). La asociación de dichos fármacos (KTZ, TRI y MXD) a las nanopartículas a base de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA (invención) no afectó al porcentaje de nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de un copolímero utilizado, que se mantuvieron en el intervalo del 95% o superior (tablas 6-8). Por otra parte, se ha observado que el uso de las nanopartículas a base de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA (invención) mejora la solubilidad de compuestos poco o parcialmente solubles en agua dando lugar a una inhibición efectiva de la formación de cristales del fármaco correspondiente en medios acuosos.

El ejemplo 6 describe la producción de nanopartículas a base de un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA (invención) cargadas con ketoconazol; dicho nanosistema puede ser aplicado como un sistema de administración de fármacos para la liberación controlada de agentes antifúngicos poco o parcialmente solubles en agua. Se obtuvieron nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y vehículos lipídicos nanoestructurados (NLC) con ketoconazol (KTZ) mediante la técnica de homogenización en caliente de alta presión, aunque las formulaciones lipídicas del KTZ mostraron una cierta inestabilidad física y química. Sin embargo, las nanopartículas cargadas con KTZ basadas en un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA proporcionadas por esta invención, que contienen KTZ en concentraciones diferentes del polímero, fueron homogéneas (alrededor de 200-235 nm de tamaño promedio), lo que indica la ausencia de cristales del fármaco, cuyo tamaño es de alrededor de 2-10 µm. Estos cristales de fármaco sólo se observaron tras el tratamiento de soluciones alcohólicas de KTZ de la misma manera que las soluciones alcohólicas del semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA que contenían KTZ utilizadas para formar las nanopartículas. Este hecho fue observado después de la visualización tanto de los cristales de KTZ como de las nanopartículas cargadas con KTZ basadas en semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA por microscopía electrónica de barrido (SEM) (figura 7). Resultados similares se obtuvieron a partir de SEM para las nanopartículas dejadas a temperatura ambiente durante al menos 2 meses en donde no se observó crecimiento o formación de cristales (figura 7C). Estos resultados indican que las nanopartículas cargadas con KTZ basadas en semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA mejoran la solubilidad en agua de los fármacos hidrofóbicos, como el KTZ, e inhiben la cristalización o precipitación del KTZ en la suspensión final acuosa de dichas nanopartículas.

Del mismo modo, la eficacia de encapsulación del triclosán (TRI) fue de aproximadamente el 97% de la cantidad inicial añadida en las nanopartículas cargadas con TRI a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención) obtenidas según el método de desplazamiento de disolvente y alrededor del 80% de las nanopartículas cargadas con TRI de la invención obtenidas por la técnica de auto-ensamblaje *in situ*. Los tamaños de las nanopartículas cargadas con TRI proporcionadas por la presente invención que contienen TRI a diferentes concentraciones (0,12% y 0,2% (w/v)) en la suspensión acuosa de las nanopartículas cargadas con TRI a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA fueron homogéneos (alrededor de 140 nm), lo que indica la ausencia de cristales de fármaco cuyo tamaño es de alrededor de 50 a 200 µm (figura 8A). Estos cristales del fármaco sólo se observaron tras el tratamiento de las soluciones alcohólicas de TRI de la misma manera que las soluciones alcohólicas del semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA que contienen TRI utilizadas para formar las nanopartículas. Este hecho fue observado después de la visualización de los cristales del TRI y de las nanopartículas cargadas con TRI a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA por SEM (figura 8B). Estos resultados indican que las nanopartículas cargadas con TRI a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA mejoran la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos, debido a la ausencia de cristales de fármaco en la formulación de nanopartículas de TRI. Además, parece que la encapsulación de TRI en dichas nanopartículas previstas por la presente invención inhibe la formación de cristales (cristalización) y la precipitación del TRI en la suspensión final acuosa de dichas nanopartículas.

Diferentes estudios describen la inclusión del TRI en micropartículas y nanopartículas poliméricas mediante el uso de técnicas de emulsificación complicadas y disolventes orgánicos tóxicos. En este contexto, se prepararon nanopartículas de Eudragit® cargadas con TRI para el tratamiento del acné por emulsificación-difusión mediante el método de desplazamiento de disolvente, utilizando Eudragit® E 100 como polímero. A pesar de que se obtuvo una alta eficiencia de encapsulación (95,5%), la producción de las nanopartículas requiere técnicas complicadas, incluyendo un procedimiento de emulsificación usando un disolvente orgánico tóxico (metiletilcetona) [17]. Del mismo modo, se prepararon nanopartículas cargadas con TRI mediante el uso de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(D,L-lactida) (PLA) y ftalato de acetato de celulosa (CAP) y de poli(alcohol vinílico) (PVA) como estabilizador. Estas nanopartículas cargadas con TRI fueron diseñadas para el tratamiento periodontal a base de polímeros no bioadhesivos tales como PLGA. La eficacia de encapsulación fue de alrededor del 63% y se aplicó el complicado procedimiento de emulsificación-difusión para obtener las nanopartículas. Además, se prepararon microcápsulas de quitosano/gelatina que contenían TRI mediante el método de secado por pulverización ("spray

drying”). Se prepararon microesferas de polímeros, cargadas con TRI, mucoadhesivas mediante la técnica de doble emulsión y evaporación del disolvente para su aplicación en la cavidad oral, donde el TRI se incorporó en microesferas preparadas a partir de Gantrez® MS-955, Carbopol® 974P, policarbófilo o quitosano. En general, la eficacia de carga del TRI fue de alrededor del 30% para todos los polímeros utilizados a excepción de quitosano (70%); sin embargo, se reportaron algunas dificultades para encapsular el TRI con esta técnica debido a que el TRI lipofílico tiende a migrar a la fase de aceite exterior.

El minoxidil (MXD) se utiliza por vía tópica en el tratamiento de la alopecia androgénica. Habitualmente, el minoxidil se incorpora en una mezcla de disolventes, principalmente propilenglicol:etanol:agua. Los efectos secundarios típicos de este tratamiento tópico incluyen la dermatitis irritante junto con prurito, eritema, descamación y sequedad, que se producen sobre todo en el inicio de la terapia. En algunos casos, se ha observado dermatitis alérgica de contacto o exacerbación de la dermatitis seborreica. El propilenglicol (PG) puede causar en algunos pacientes prurito y descamación del cuero cabelludo que pueden ser las causas más comunes de estos síntomas incluyendo dermatitis de contacto irritante, dermatitis alérgica de contacto, o una exacerbación de la dermatitis seborreica.

Por otra parte, los trabajos publicados describen los experimentos relacionados con la evaporación de los disolventes a partir de la mezcla de PG:etanol:agua (20:60:20, v/v). Uno de los problemas principales de las formulaciones que contienen esta mezcla de disolventes es la evaporación tras la aplicación en el cuero cabelludo. La evaporación de etanol después de la aplicación puede formar PG concentrado y así conseguir la sobresaturación que conduce a la precipitación del fármaco. La cantidad de la formulación aplicada influye en la velocidad de evaporación y, por tanto, en el tiempo en que el MXD precipita. La precipitación limita la cantidad de MXD que puede ser absorbida y conduce a una mala absorción percutánea del fármaco. Asimismo, otro estudio analizó el tiempo de evaporación y su relación con la concentración del MXD, en donde el etanol puede haber sido evaporado después de la primera media hora y después de 2 horas, siendo el PG el único vehículo remanente. Para la solución de MXD al 3%, el MXD permaneció en el vehículo durante todo el período de observación de dos horas, pero la siembra produjo inmediatamente un precipitado abundante que confirma la presencia de una solución sobresaturada. Hasta cierto punto, la formación de cristales de MXD en el cuero cabelludo puede provocar la formación de aspecto similar al de la caspa, no elegante para el aspecto del cabello.

Estos resultados estaban en conformidad con los resultados obtenidos en esta invención, en donde se realizó un ensayo macroscópico y microscópico general para (i) nanopartículas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA que contienen MXD (2%) con diferentes excipientes (invención), (ii) una formulación comercial de MDX que contiene etanol, PG y agua (Lacovin® 2%), y (iii) una formulación comercial que contiene, gamma-ciclodextrinas, PG, etanol y agua (Alopex® 2%). En este contexto, los datos obtenidos en la figura 10 indican que el aspecto de las muestras antes de su secado es lechoso para la formulación de nanopartículas (i) y transparente para los productos comerciales (ii) y (iii). Sin embargo, después de 2 horas de secado, comenzó a observarse una película cristalina para los productos comerciales con una gran capa visual de cristal blanco. La muestra que contenía las nanopartículas cargadas con MXD proporcionadas por la invención con glicerol tenía un ligero aspecto lechoso, elegante, sin precipitado cristalino. Además, las nanopartículas cargadas con MXD proporcionadas por la invención con diferentes excipientes (NPGES-MXD, NPGES MXD PEG y NPGES MXD PG) no formaron una película seca después de 12 horas. Sin embargo, se observaron precipitados secos a las 2 horas para los productos comerciales y a las 4 horas para las nanopartículas cargadas con MXD de la invención sin excipientes. El examen microscópico confirmó los resultados macroscópicos, en donde se observaron los cristales grandes en los productos comerciales Lacovin® 2% y Alopex® 2% en las primeras 2 horas. No hubo diferencias significativas entre el aspecto de la película residual de las formulaciones de nanopartículas cargadas con MXD. En este contexto, las nanopartículas cargadas con MXD de la invención sin excipientes mostraron una película residual estriada y frágil (NPGES-MXD). Este fenómeno no se observó para las películas residuales de nanopartículas secas cargadas con MXD de la invención que contenían excipientes, tales como propilenglicol (PG), glicerol (G) o polietilenglicol 400 (PEG). Además, no se detectaron grandes cristales en ninguna de las películas secas que contenían las nanopartículas cargadas con MXD de las formulaciones de la invención. De manera similar, la figura 11 muestra el SEM realizado para la formulación de las nanopartículas cargadas con MXD de la invención y de los productos comerciales. Los datos obtenidos a partir de dicha figura 11 se correlacionan exactamente y confirman los resultados obtenidos en la figura 10. Para los productos comerciales (Lacovin® 2% y Alopex® 2%), se observaron grandes precipitados cristalinos. Por otra parte, no se observaron grandes cristales para la formulación de las nanopartículas cargadas con MXD de la invención (NPGES/MXD, NPGES/MXD G, NPGES/PG MXD y NPGES/MXD PEG) [ejemplo 8]. Tanto las nanopartículas cargadas con MXD de la invención sin excipientes (NPGES/MXD) como las nanopartículas cargadas con MXD de la invención con glicerol (NPGES/MXD G) mostraron la presencia de una película homogénea que contenía las nanopartículas con un tamaño medio de distribución homogénea. Sorprendentemente, no se detectaron nanopartículas en las películas secas que contenían nanopartículas cargadas con MXD de la invención con PG o con PEG, lo que puede ser debido a la solubilidad de los polímeros en estos excipientes, después de la evaporación del agua. Es importante señalar que se observaron algunos precipitados grandes (capas de películas poliméricas) en la formulación que contenía PEG 400, lo que puede estar relacionado con la interacción de algunos grupos carboxílicos del polímero con PEG. Todas las películas eran elegantes, con una textura ligeramente pegajosa.

Por otra parte, se han utilizado ciclodextrinas (CD) para preparar un complejo de inclusión con el MXD con el fin de

investigar tanto la solubilidad del MXD como la permeabilidad de la piel [21]. Se prepararon fases cúbicas de monooleína (MO) que atrapan complejos de hidroxipropil beta-ciclodextrina (HPbetaCD)/minoxidil (MXD) por hidratación de MO fundida con la solución de complejo. Se prepararon las nanopartículas de la fase cúbica en un tipo de baño de ultrasonidos usando Pluronic® F127 como dispersante. La permeabilidad, *in vitro*, de la piel del MXD cargado en la fase cúbica fue mayor que la del MXD disuelto en PG/agua/etanol (20/30/50, v/v/v), pero la cantidad del MXD que se mantuvo dentro de la piel fue mayor con la solución de MXD que con las nanopartículas cargadas con MXD. Estos datos indicaron que aunque se aplicaron complejos de CD-MXD, los residuos con aspecto cristalino que quedaban en el cuero cabelludo se detraían en menor grado que con la solución de MXD.

En resumen, según esta invención, las nanopartículas cargadas con el MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA se han diseñado con el objetivo de desarrollar sistemas de administración de fármacos para el tratamiento de la alopecia androgénica. La ventaja más importante de las nanopartículas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención) como sistemas de administración de fármacos, en comparación con las formulaciones comerciales analizadas, se relaciona con la facilidad de fabricación, evitar el uso de PG como vehículo alérgico y con la ausencia de fenómenos de formación de cristales en el cuero cabelludo.

Otro de los objetivos de la presente invención se refiere al desarrollo de nanopartículas bioadhesivas basadas en semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA que son capaces de mantenerse adheridas al pelo, durante mucho tiempo, bajo diferentes condiciones. Las aplicaciones de dichos nanosistemas en productos cosméticos pueden ser beneficiosas para transportar las moléculas al tallo del cabello o para ofrecer protección contra factores externos agresivos y podrían aumentar el volumen del cabello. Los resultados indican que la cantidad de la fracción adherida en muestras de pelo fue alrededor de 9,5 µg de nanopartículas por cm² de superficie del pelo para el grupo 1 (M1). En el otro grupo de muestras de cabello (M2), aunque la cantidad de la fracción adherida de las nanopartículas se redujo mediante un lavado del cabello, se encontró que las nanopartículas todavía estaban adheridas a la superficie del cabello (3,5 µg de nanopartículas por cm² de superficie del pelo). La fluorescencia y SEM (figuras 12 y 13), confirmaron la alta afinidad adhesiva inicial de la suspensión de las nanopartículas cargadas con MXD proporcionadas por la invención por la superficie del cabello. Además, la película seca de las nanopartículas adheridas a la superficie del cabello en el grupo 1 (M1) resistió las condiciones de alta temperatura y lavado y las nanopartículas se mantuvieron adheridas a la superficie del cabello tal como se ve en el grupo 2 (M2). Además, el aspecto del cabello que contenía la película de las nanopartículas cargadas con MXD de la invención era elegante, transparente, brillante y no mostró ningún residuo negro después del secado (ejemplo 9).

Por último, se llevó a cabo un estudio *ex vivo* de bioadhesión de las nanopartículas bioadhesivas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención) en la mucosa bucal y en la lengua de un modelo animal porcino (ejemplo 10). El objetivo de ese trabajo se centró en la cuantificación de la fracción adherida de las nanopartículas a la superficie de la mucosa y el tiempo de permanencia de estos sistemas adhesivos en comparación con nanopartículas de Gantrez® AN de referencia. La figura 14 muestra la cantidad de la fracción adherida acumulativa de las formulaciones de nanopartículas (µg de NP/cm² de tejido) para semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención) y para copolímeros de Gantrez® AN tanto en mucosa porcina bucal como en mucosa dorsal de la lengua. En general, las nanopartículas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención) (NP GESR) muestran una capacidad adhesiva superior a las nanopartículas cargadas con MXD a base de Gantrez® AN (NP GANR). Sin embargo, ambos tipos de nanopartículas mostraron una fuerza adhesiva inicial similar a tiempo 0. Sin embargo, a 1, 2,5, 4 y 6 horas, las cantidades acumulativas adheridas de las nanopartículas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (invención), en ambos tipos de mucosa porcina fueron aproximadamente 2-3 veces mayores que las de las nanopartículas cargadas con MXD a base de Gantrez® AN. En el caso de las formulaciones en gel que contenían las nanopartículas, se ha observado que el gel de hialuronato mejora la capacidad adhesiva inicial de las nanopartículas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (GELNP GES) y era dos veces superior a la de la suspensión de nanopartículas. Además, a 1, 2,5, 4 y 6 horas, se observó una mejora considerable de la capacidad bioadhesiva para el gel que contenía nanopartículas cargadas con MXD a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA. Sorprendentemente, este fenómeno no se observó en el caso de las formulaciones en gel de nanopartículas a base de Gantrez® AN, en donde no se encontraron diferencias significativas entre suspensiones acuosas (NP GANR) y gel que contenía nanopartículas de Gantrez® AN (NP GEL GAN).

La figura 15 muestra las imágenes de microscopía de fluorescencia de ambos tejidos de la mucosa bucal después de 0,5 y 2,5 horas de la administración de algunas formulaciones de nanopartículas marcadas con fluorescencia. El tejido de control (sin la formulación de nanopartículas) muestra una baja intensidad de fluorescencia en el tejido (figura 15B). Nanopartículas cargadas con rodamina B a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA mostraron una alta intensidad de fluorescencia en la capa mucosa de la mucosa bucal a las 0,5 horas tras su incubación tejido en fluido salival (figura 15C), que fue similar tras 2,5 horas (figura 15E). Por otro lado, la intensidad de fluorescencia de los tejidos para las nanopartículas de Gantrez® AN disminuyó desde las 0,5 a las 2,5 horas después de la incubación y fue aproximadamente similar a la del control a las 2,5 horas posteriores a la administración (figuras 15D y 15F). Estos datos confirman que las nanopartículas de la invención, a base de

semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA, tienen una mayor afinidad y mayor tiempo de residencia en la mucosa bucal que las nanopartículas de Gantrez® AN. Además, se observó que las nanopartículas no penetran en el tejido sub-mucoso en ninguno de los casos.

La figura 16 muestra las imágenes de microscopía de fluorescencia en la superficie del dorso de la mucosa de la lengua a las 2,5 h tras la administración de las formulaciones de nanopartículas marcadas con fluorescencia. En un tejido similar al tejido de la mucosa bucal, las nanopartículas de la invención, a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA, mostraron una mayor afinidad y un mayor tiempo de residencia en la mucosa dorsal de la lengua porcina (figuras 16C y 16D) que las nanopartículas a base de Gantrez® AN (figura 16B).

De acuerdo con la caracterización de polímeros, las nanopartículas a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA (por ejemplo, Gantrez® ES) muestran una afinidad bioadhesiva mayor en las superficies de la mucosa bucal y de la lengua del modelo porcino que las nanopartículas basadas en otros polímeros de Gantrez®, lo que garantiza una mejora efectiva de la liberación controlada de muchos compuestos. Sorprendentemente, los semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA, así como las nanopartículas a base de dichos polímeros, tienen un efecto de co-disolvente para compuestos poco o escasamente solubles en agua que permite una mejora de la eficacia de encapsulación de fármacos hidrofóbicos, por ejemplo, KTZ, TRI o MXD. Así, dichos semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA parecen garantizar una alta eficiencia de encapsulación para la incorporación de compuestos hidrofílicos, y especialmente, hidrofóbicos, sin necesidad de utilizar co-disolventes o agentes complejantes. Las propiedades adhesivas y la estabilidad acuosa de las nanopartículas a base de semiésteres de alquilo (C₁-C₄) de copolímeros de PVM/MA, entre otras propiedades, hace que estas nanopartículas sean potencialmente aplicables en muchas industrias, por ejemplo, farmacéutica, cosmética, agrícola o alimentaria, como productos de liberación controlada de sistemas de administración de interés para diferentes superficies, incluyendo el cabello, piel, rutas bucal, oral, nasal, vaginal y rectal, entre otras.

Referencias bibliográficas

1. Illum, L., et al., Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. 51(1-3): p. 81-96.
2. Read, R.C., et al., Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine*, 2005. 23(35): p. 4367-74.
3. Mills, K.H., et al., Protective levels of diphtheria-neutralizing antibody induced in healthy volunteers by unilateral priming-boosting intranasal immunization associated with restricted ipsilateral mucosal secretory immunoglobulin a. *Infect Immun*, 2003. 71(2): p. 726-32.
4. Finne, U., K. Ronkko, y A. Urtti, Timolol release from matrices of monoesters of poly(vinyl methyl ether-maleic anhydride): effects of polymer molecular weight and a basic additive. *J Pharm Sci*, 1991. 80(7): p. 670-3.
5. Finne, U., V. Vaisanen, y A. Urtti, Modification of ocular and systemic absorption of timolol from ocular inserts by a buffering agent and a vasoconstrictor. *Int J Pharm*, 1990. 65: p. 19-27.
6. EP 451390.
7. Arbos, P., et al. *J Control Release*, 2003. 89(1):19-30.
8. Arbos, P., et al., Nanoparticles with specific bioadhesive properties to circumvent the pre-systemic degradation of fluorinated pyrimidines. *J Control Release*, 2004. 96(1): p. 55-65.
9. Kockisch, S., et al., Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005. 59(1): p. 207-16.
10. Kockisch et al. *J Pharm Sci*, 2003. 92(8):1614-23.
11. Marchais, H., et al., Entrapment efficiency and initial release of phenylbutazone from nanocapsules prepared from different polyesters. *Drug Dev Ind Pharm*, 1998. 24(9): p. 883-8.
12. Arbos, P., et al., Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *Int J Pharm*, 2002. 242(1-2):129-36.
13. Salman, H.H., et al., Bioadhesive mannosylated nanoparticles for oral drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol*, 2006. 6(9-10):3203-9.
14. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, et al., First-derivative ultraviolet spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of ketoconazole in pharmaceutical emulsions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. 42(1):91-98].

15. Gehan Balata, M.M., Rania Abu Bakera, Improvement of solubility and dissolution properties of ketoconazole by solid dispersions and inclusion complexes. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. 5(1): p. 1-12.
- 5 16. Kwon & Kim, In vitro skin permeation of monoolein nanoparticles containing hydroxypropyl beta-cyclodextrin/minoxidil complex. Int J Pharm, 2010. 392(1-2):268-73.
17. Dominguez-Delgado, C.L., et al., Eur J Pharm Biopharm, 2011 [Epub ahead of print].
- 10 18. Takeuchi, H.H., et al., Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. Adv. Drug Deiv. Rev., 2001, 47(1):39-54.
- 15 19. Peh & Wong, Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. J Pharm Pharm Sci, 1999. 2(2):53-61.
- 20 20. Perioli, L., et al., Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. J Control Release, 2004. 95(3):521-33.
21. Kim, J.C. and M.D. Kim, J Microbiol Biotechnol, 2007. 17(12):1965-9.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en:

5 a) una nanoesfera matricial, en donde dicha nanoesfera matricial comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA); y

10 b) una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa, en donde dicha nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C_1-C_4) del copolímero (PVM/MA).

2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en donde el alquilo (C_1-C_4) es etilo, isopropilo o n-butilo.

15 3. Nanopartícula según la reivindicación 1, que además comprende un producto de interés.

4. Una composición que comprende al menos una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo.

20 5. Composición según la reivindicación 4, en donde dicha nanopartícula comprende un producto de interés.

6. Composición según la reivindicación 5, en donde dicho producto de interés es un herbicida, un insecticida, un fungicida, un producto anti-envejecimiento, un producto anti-acné, un producto de cuidado facial, un cosmético pigmentado, un cosmético, un producto de cuidado personal, un producto bronceador/protector solar, un producto para limpieza de dientes, pastas de dientes o enjuagues, un producto para champús, un perfume, un producto para el cabello, ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, monofosfato de tiamina, pirofosfato de tiamina, trifosfato de tiamina, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos, ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, una vitamina de las familias A, D, E, K y sus derivados, un fosfolípido, un carotenoide, un ácido graso, un ácido graso omega-3, un aminoácido, un fitoestanol, un fitoesterol, un polifenol, un agente analgésico, un agente antialopecia, un agente antianginoso, un agente antibacteriano, un agente antidepresivo, un agente antifúngico, un agente antihipertensivo, un agente antiinflamatorio, un agente antineoplásico, un agente antipirético, un agente antipsicótico, un agente ansiolítico, un agente broncodilatador, un glucocorticoide, un agente inmunosupresor, o cualquier combinación de los mismos.

35 7. Una composición que comprende:

a) un componente seleccionado del grupo que consiste en:

40 i. al menos una nanopartícula según las reivindicaciones 1 ó 2 que además comprende un producto de interés; y

45 ii. una solución o suspensión que contiene un semiéster de alquilo (C_1-C_4) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) y un producto de interés en un medio, comprendiendo dicho medio un alcohol volátil miscible en agua y un medio acuoso, donde la cantidad de medio acuoso es menor que la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas; y

50 b) un vehículo

en donde dicho producto de interés se selecciona del grupo que consiste en ácido acetilsalicílico, péptido natriurético auricular alfa, arginina vasopresina, atropina, augmerosen, atorvastatina, bevacizumab, calcitoninas, gonadotropinas coriónicas, corticotropina, desmopresina, epibatidina, cetuximab, exenatida, trastuzumab, adalimumab, ketoconazol, lanreótido, lutropina alfa, metoprolol, minoxidil, nesiritida, octreótido, paclitaxel, paracetamol, pegaptanib, hormona folículo estimulante recombinante, factores de crecimiento recombinantes, infliximab, rituximab, sermorelina, somatotropina, un derivado del taxano, taxol, acetato de teriparatida, tirotropina, triclosán, urofollitropina, omalizumab, actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, glucurónido de estradiol, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipino, fenotiazinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, gentamicina, griseofulvina, hidrocloridato de imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaempferol, levofloxacino, lidocaína, loperamida, losartán, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, nisoldipino, morfina, nelfinavir, nicardipino, nitrendipino, nifedipino, ondansetrón, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona,

prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutina, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimús, sulfametizol, tacrolimús, tamoxifeno, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecán, triamcinolona, valsopodar, verapamilo, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona, y mezclas de los mismos.

- 5 8. Un producto comestible que comprende una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Nanopartícula según la reivindicación 3, en donde el producto de interés es minoxidil, para su uso en el tratamiento de la pérdida del cabello.
- 10 10. Nanopartícula según la reivindicación 3, en donde el producto de interés es triclosán o ketoconazol, para su uso en el tratamiento de una infección bucal.
- 15 11. Un procedimiento para producir una nanoesfera matricial que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), donde dicho procedimiento comprende poner en contacto una solución o suspensión orgánica que contiene un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA con un medio acuoso para formar dicha nanoesfera matricial.
- 20 12. Un procedimiento para producir una nanoesfera matricial que comprende un producto de interés, donde dicha nanoesfera matricial comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), donde dicho procedimiento comprende:
 - 25 (a) poner en contacto una solución o suspensión alcohólica o hidroalcohólica que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso; o, alternativamente,
 - 30 (b) poner en contacto una solución o suspensión alcohólica que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso; o, alternativamente,
 - 35 (c) poner en contacto una solución o suspensión orgánica que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) del copolímero de PVM/MA con un medio acuoso, donde dicha solución o suspensión orgánica comprende un disolvente no-volátil miscible en agua.
- 40 13. Un procedimiento para producir una nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa que comprende un producto de interés, donde dicha nanocápsula vesicular de tipo núcleo y capa comprende un núcleo y una capa, comprendiendo dicha capa un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA, donde dicho procedimiento comprende poner en contacto una solución o suspensión que comprende dicho producto de interés y dicho semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA con un medio acuoso.
- 45 14. Un procedimiento para producir una nanopartícula mediante eliminación del disolvente en una solución o suspensión hidroalcohólica que contiene un semiéster de alquilo (C₁-C₄) de un copolímero de PVM/MA y un alcohol miscible en agua, en donde la cantidad de agua es inferior a la cantidad de agua necesaria para formar las nanopartículas.
15. Un procedimiento según la reivindicación 14, que además comprende un producto de interés.

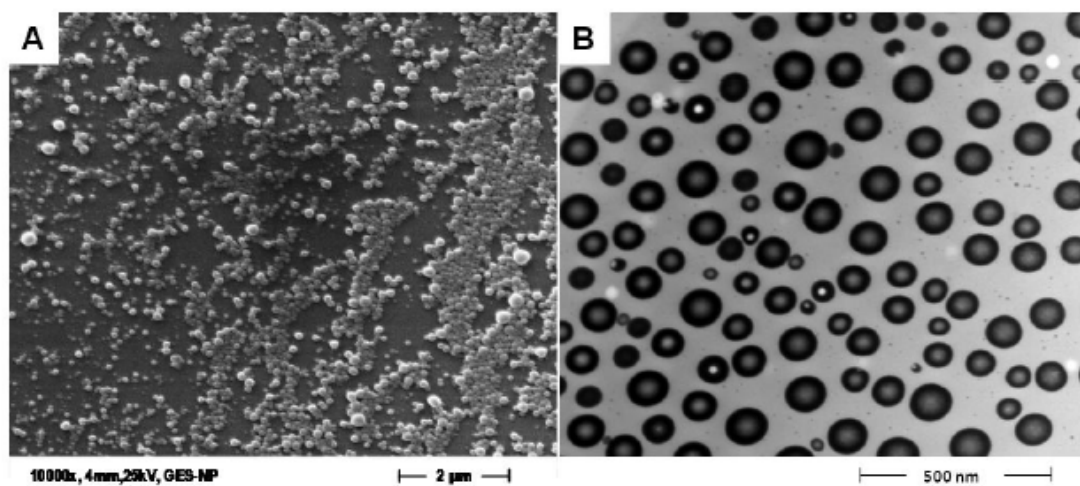


Fig. 1

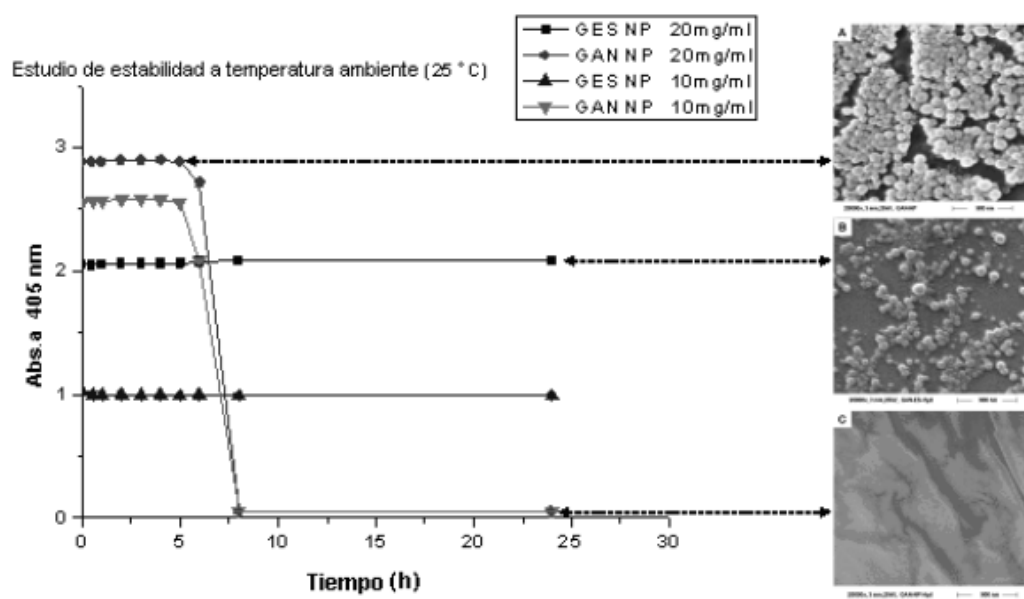


Fig. 2

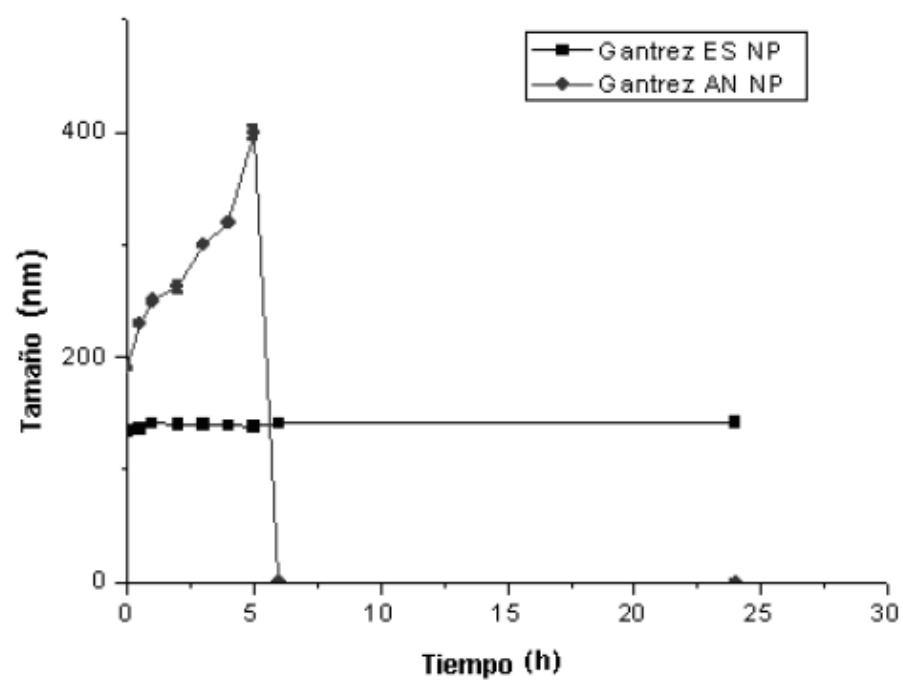


Fig. 3

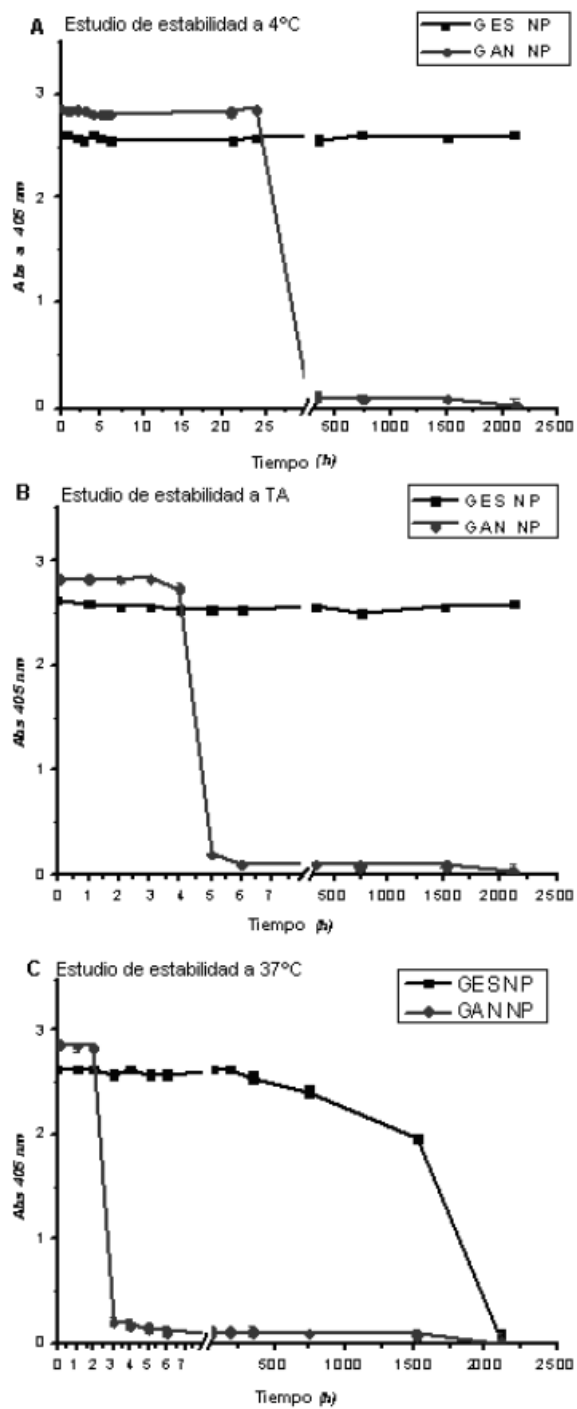


Fig. 4

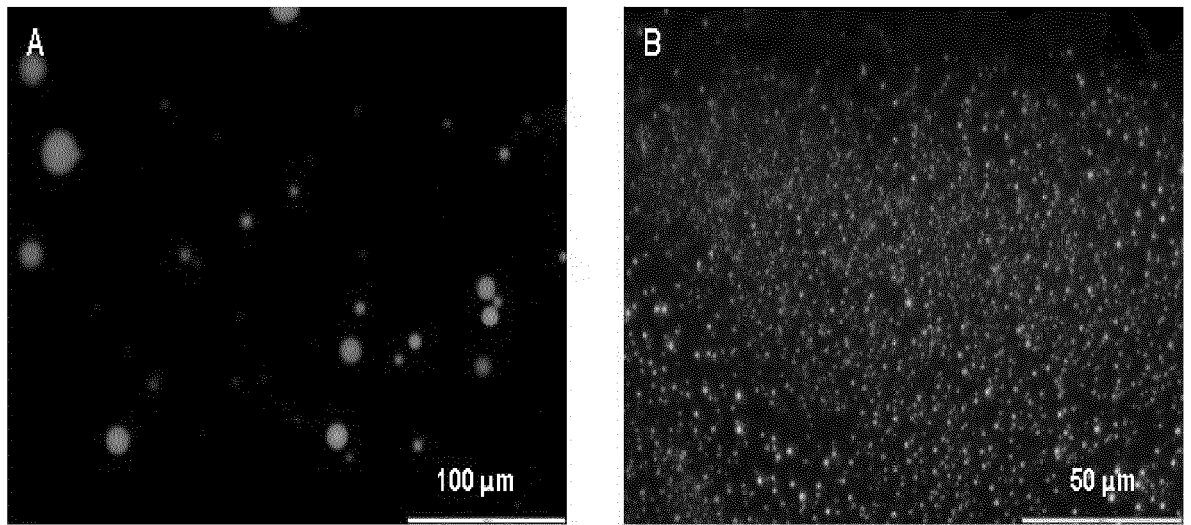


Fig. 5

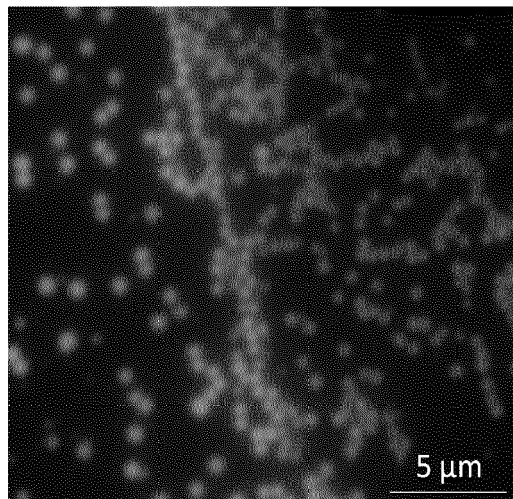


Fig. 6

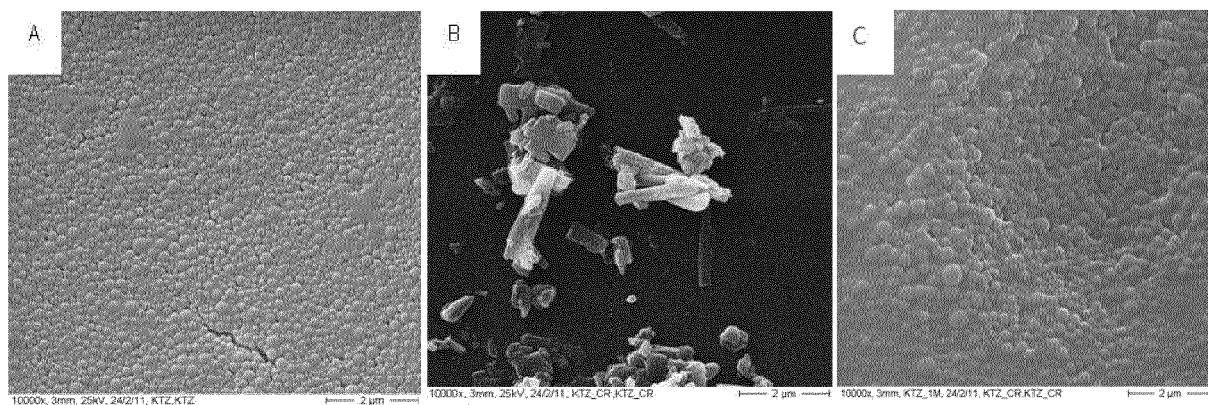


Fig. 7

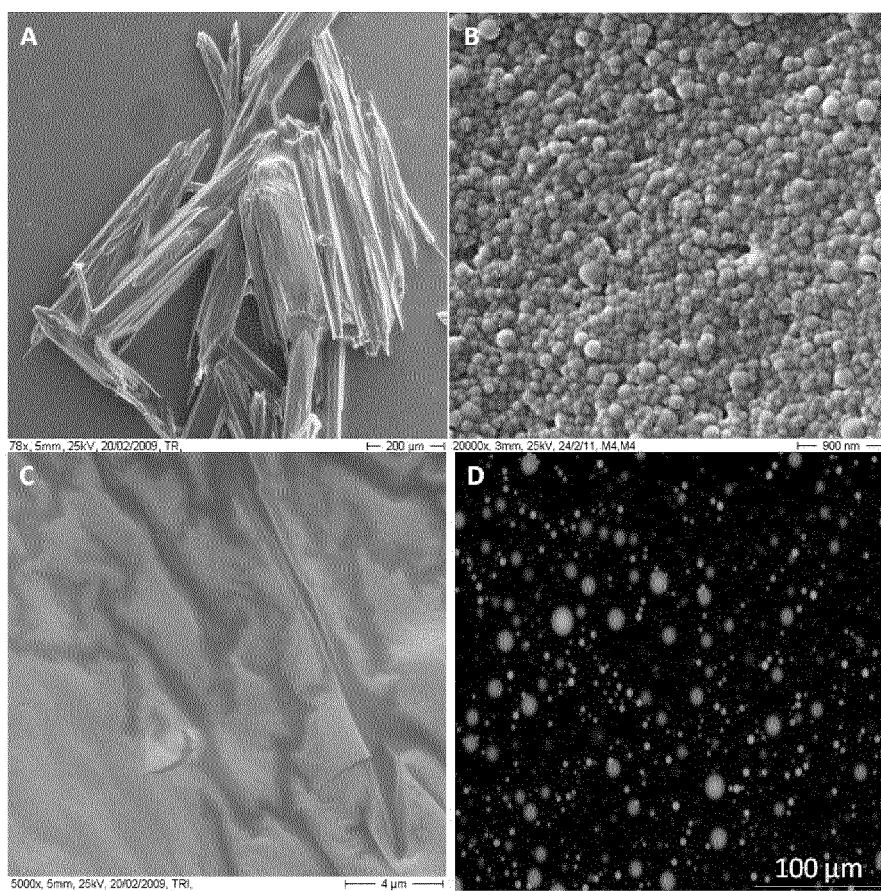


Fig. 8

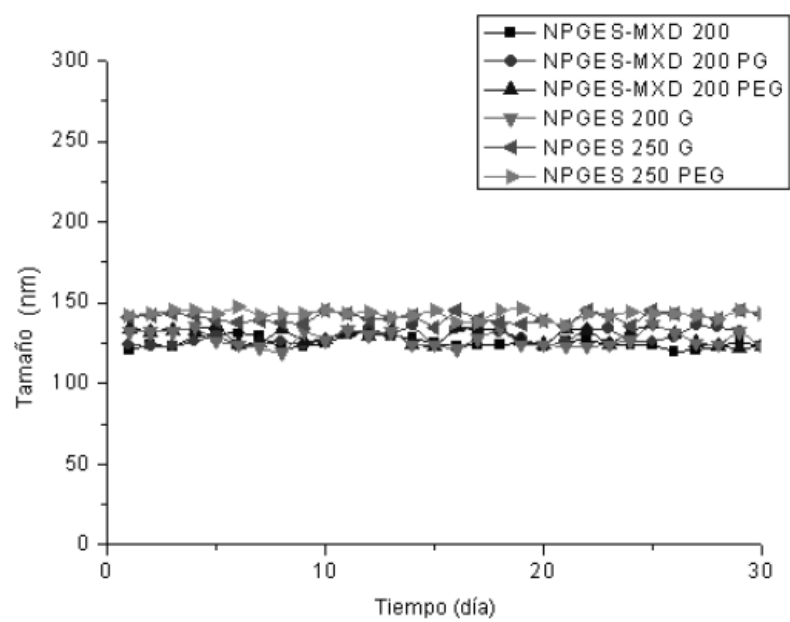


Fig. 9

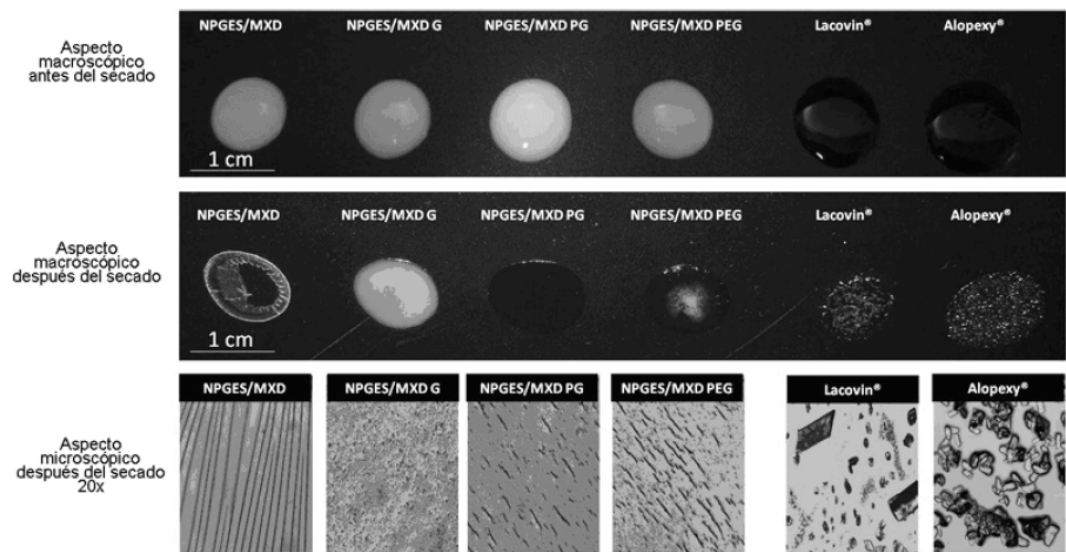


Fig. 10

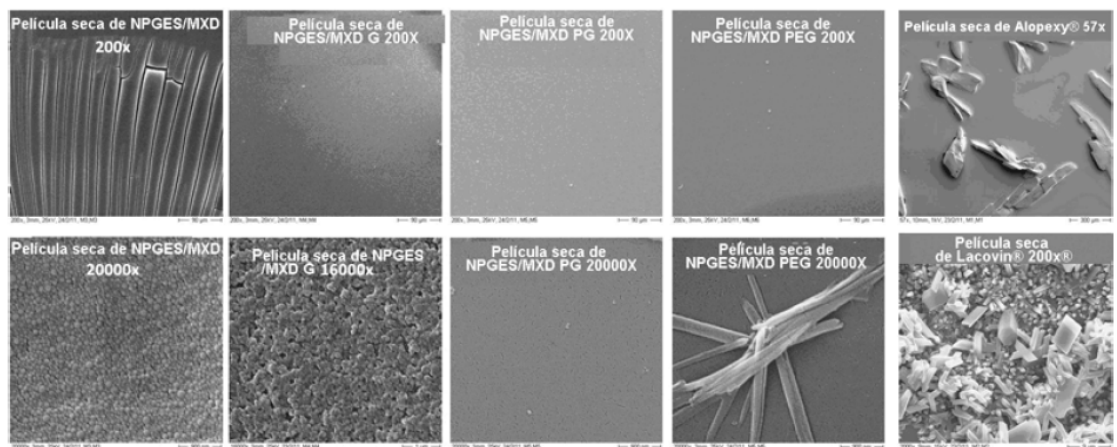


Fig. 11

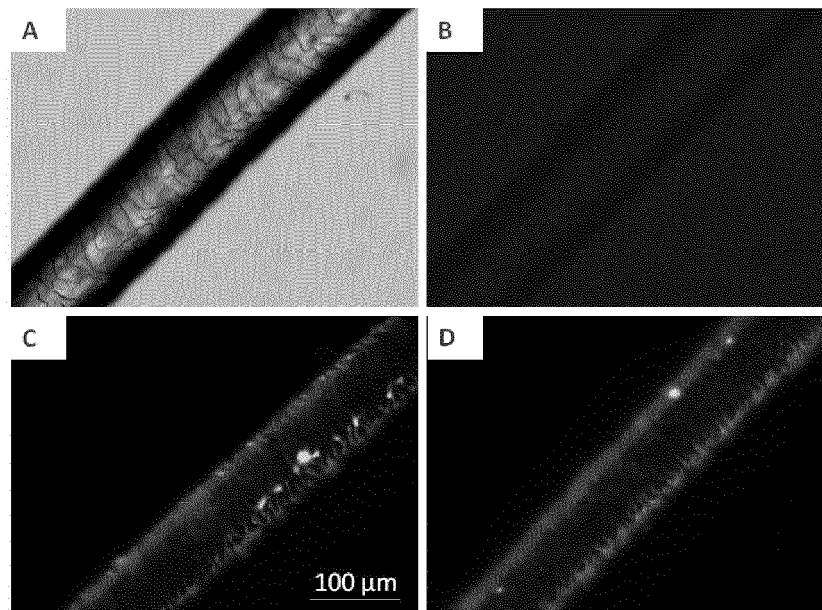


Fig. 12

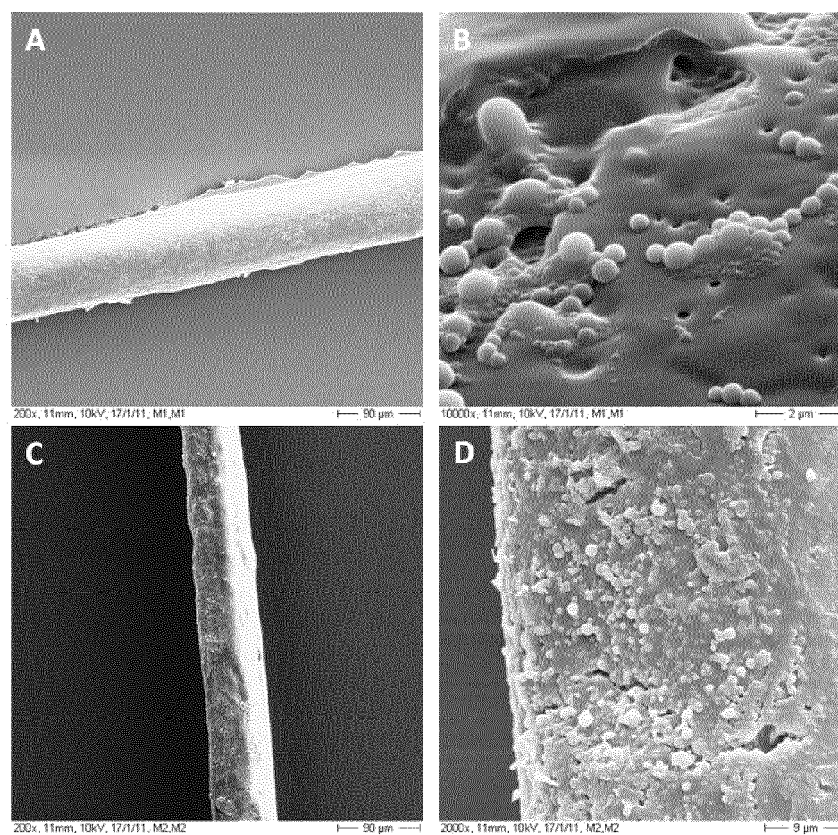


Fig. 13

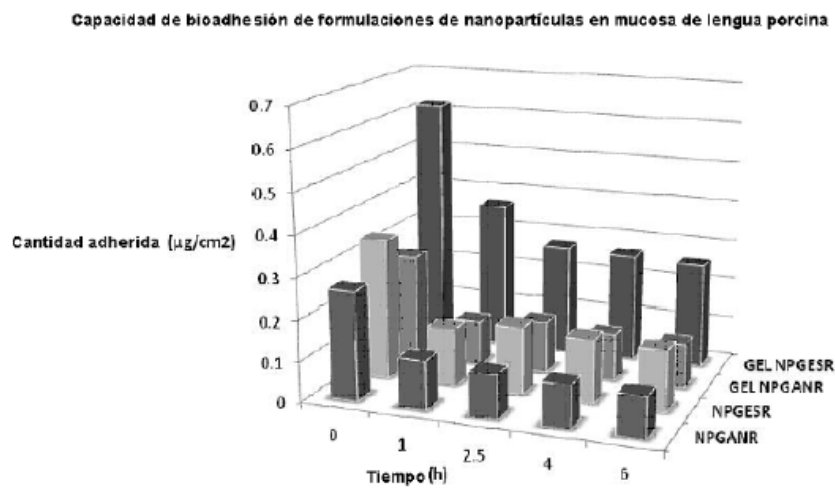
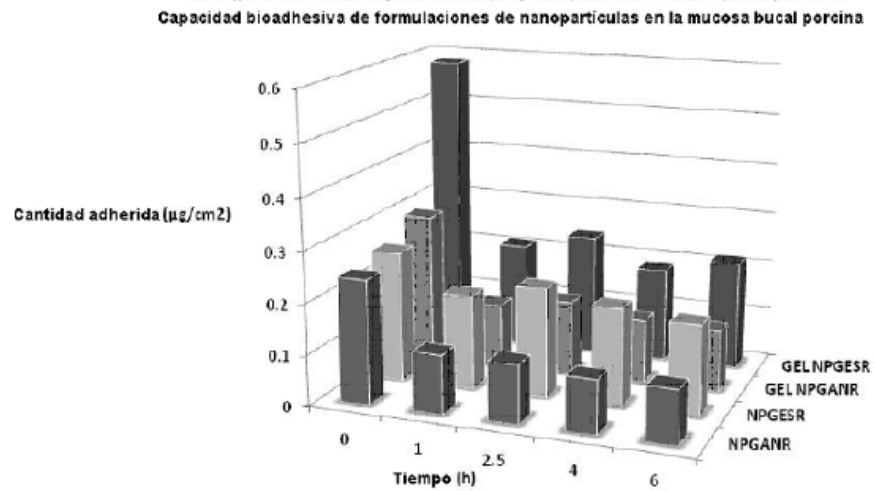


Fig. 14

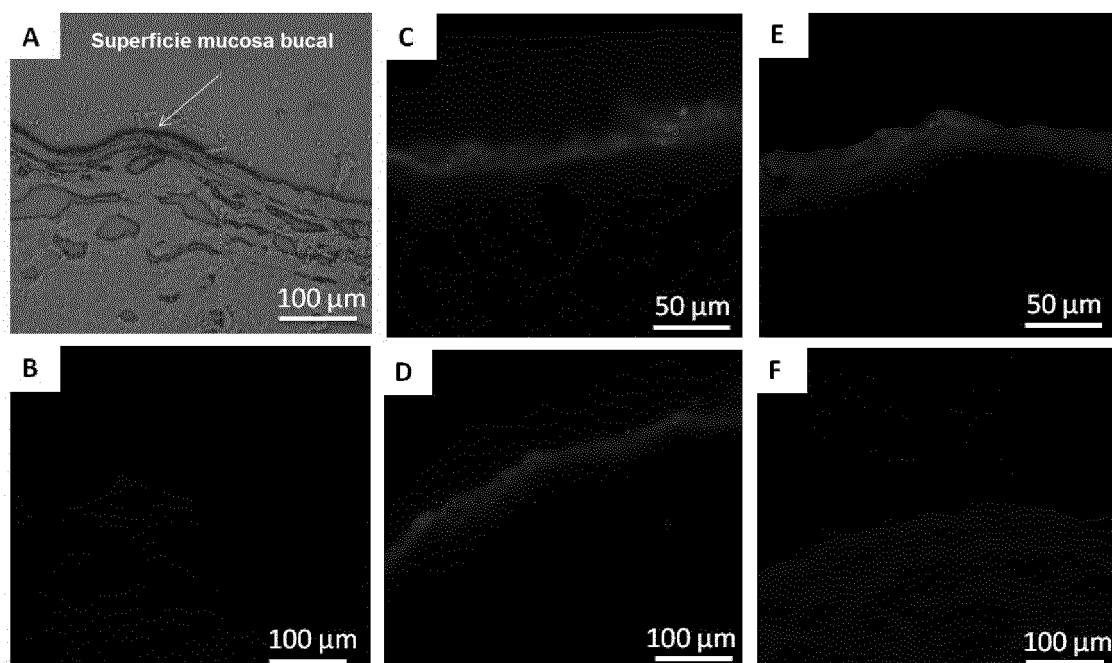


Fig. 15

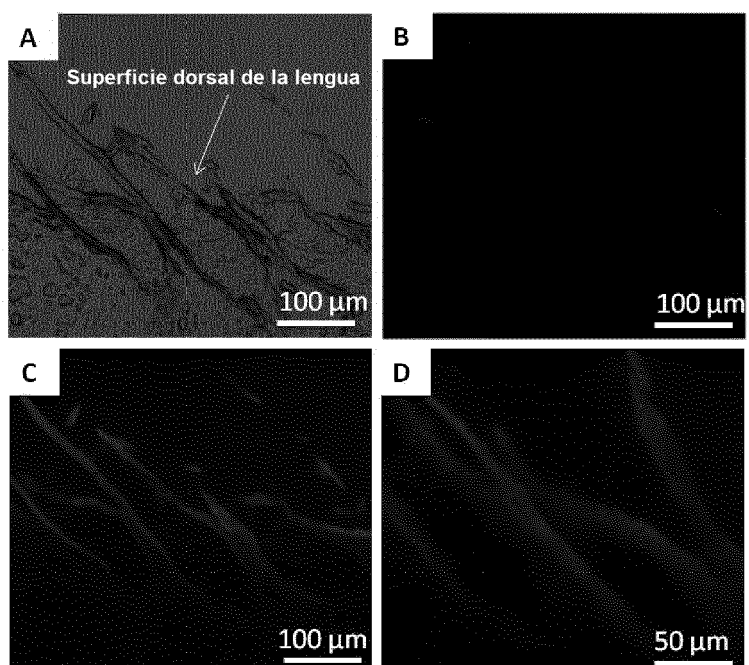


Fig. 16