

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 201**

21 Número de solicitud: 202031135

51 Int. Cl.:

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.11.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.05.2022

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**TALLÓ DOMÍNGUEZ, Kirian y
LÓPEZ SERRANO, Olga**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **HIDROGEL LIPÍDICO, PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y USO DEL MISMO**

57 Resumen:

Hidrogel lipídico, procedimiento de preparación y uso del mismo.

La presente invención se refiere a un hidrogel lipídico nanoestructurado formado por red tridimensional de láminas y vesículas interconectadas que comprende al menos un fosfolípido zwitteriónico y agua (entre un 70% y un 97% en peso). El hidrogel no comprende polímeros, tensoactivos, ácidos grasos ni alcoholes grasos. La presente invención también se refiere a su procedimiento de preparación y a su uso, especialmente como sistema de liberación de principios activos.

ES 2 910 201 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrogel lipídico, procedimiento de preparación y uso del mismo

5 El objeto de la invención es un hidrogel lipídico nanoestructurado formado por red tridimensional de láminas y vesículas interconectadas que comprende al menos un fosfolípido zwitteriónico y agua. La presente invención también se refiere a su procedimiento de preparación y a su uso, especialmente como sistema de liberación de principios activos.

10

La presente invención se podría enmarcar, por tanto, en el sector de las formulaciones en forma de gel con potenciales aplicaciones biomédicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los geles pueden describirse como materiales en los que un disolvente, ya sea acuoso u orgánico, queda atrapado dentro de una red de moléculas de solutos. Esta composición permite que los geles se comporten como sólidos blandos y líquidos viscosos dependiendo de su composición. Su comportamiento reológico está relacionado con las interacciones moleculares que actúan en su estructura microscópica. Las interacciones químicas en los geles poliméricos, como los enlaces covalentes, proporcionan una resistencia mecánica frente a la deformación. Por el contrario, las interacciones físicas en los geles supramoleculares, como las fuerzas electrostáticas, son más débiles y permiten que los geles se deformen y fluyan más fácilmente. La facilidad para combinar agentes gelificantes para formar geles con diferentes propiedades da lugar a un rápido crecimiento de los productos derivados de los geles. La comprensión de los parámetros que controlan su formación y comportamiento reológico es clave para desarrollar nuevas aplicaciones para estos materiales.

20

25

30

En el estado de la técnica se ha descrito un gel supramolecular compuesto de ácido oleico y fosfolípidos, tal y como se divulga en el documento ES2754476 A1. Este gel se formó a partir de una dispersión diluida de lípidos en agua a pH entre 5 y 8, que siguió un proceso de congelación-calentamiento. La microscopía confocal de fluorescencia reveló que la estructura del gel estaba formada por vesículas lipídicas agregadas y bicapas lipídicas. Los geles descritos en dicho documento son estables a

35

pH entre 5 y 8, lo que limita su aplicación a medios con pH comprendidos entre esos valores, no siendo útiles en medios fuertemente ácidos o básicos.

A fin de ampliar su ámbito de aplicación, la presente invención propone geles lipídicos estables y que mantienen sus propiedades reológicas en un rango más amplio de pH
5 entre 2 y 13. Así, por ejemplo, podría usarse para aplicaciones gástricas donde el pH oscila entre 1 y 4.

Cabe mencionar que los siguientes documentos del estado de la técnica

-“The interdigitated gel phase in mixtures of cationic and zwitterionic phospholipids”
Eric A. Smith, Phoebe K. Dea *Biophysical Chemistry* 196 (2015) 86–91 y

10 -“Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties” Robert B. Campbell, Sathyamangalam V. Balasubramanian, Robert M. Straubinger. *Biochimica et Biophysica Acta* 1512 (2001) 27-39.

en los que se habla de una fase gel, no hacen referencia a un material con comportamiento gel a nivel macroscópico tal como se define en el primer párrafo de
15 esta sección.

En los dos artículos que se mencionan, se describen distintas fases asociadas a la organización de las membranas lipídicas. Entre estas fases se encuentran la denominada fase gel o sólido cristalino y la fase cristal líquido (entre otras).

20 La organización en fase gel o sólido cristalino no implica que el sistema se comporte macroscópicamente como un gel, sino que a nivel molecular las cadenas hidrocarbonadas se encuentran empaquetadas dando una mayor rigidez a las membranas que forman los sistemas. Aunque la terminología utilizada “gel” sea la misma, nada tiene que ver la fase gel descrita en dichos documentos con el gel lipídico
25 de la presente invención que debido a su estructura presenta un comportamiento macroscópico de gel y propiedades reológicas adecuadas para la aplicación a la que se destinan. De hecho, las mezclas lipídicas mencionadas en los dos artículos son dispersiones diluidas o directamente se habla de liposomas con lo cual se entiende que son soluciones líquidas.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es un hidrogel lipídico nanoestructurado formado por red tridimensional de láminas y vesículas interconectadas.

35

El término “hidrogel lipídico” hace referencia a un gel cuyo componente mayoritario es agua, pero que además comprende lípidos. Los lípidos se agrupan u ordenan en estructuras en forma de láminas y vesículas dentro de una matriz acuosa.

5 En el contexto de la presente invención, el término “nanoestructurado” en referencia al hidrogel, debe entenderse como relativo a materiales con comportamiento reológico tipo gel que están organizados con al menos una dimensión por debajo de los 100 nm. Se ha observado que también se organizan en la escala micro. Es decir, están organizados tanto en la nano como en la microescala.

10

Los hidrogeles de la presente invención presentan un comportamiento de gel, ya que su valor de módulo elástico G' es superior al valor del módulo viscoso G'' en un amplio rango de frecuencias (preferiblemente entre 0.01 y 10Hz).

15 El hidrogel nanoestructurado de la presente invención, a diferencia de otros geles conocidos en el estado de la técnica, puede formarse con un contenido bajo en lípido, no siendo necesaria la intervención de polímeros, ni tensoactivos ni ácidos grasos, ni alcoholes grasos para favorecer la dispersión.

20 El primer aspecto de la presente invención se refiere un hidrogel lipídico nanoestructurado formado por una red tridimensional de láminas y vesículas interconectadas, caracterizado porque comprende:

- entre un 3% y un 30% en peso de lípidos, donde los lípidos comprenden al menos un fosfolípido zwitteriónico,

25 - entre un 70% y un 97% en peso de agua

y donde el hidrogel no comprende polímeros, tensoactivos, ácidos grasos ni alcoholes grasos.

Los fosfolípidos son moléculas anfífilas que están formadas por dos partes
30 químicamente diferentes: una cabeza polar hidrófila y una o dos cadenas hidrocarbonadas hidrófobas. De acuerdo con la naturaleza de la cabeza polar de los fosfolípidos, éstos se pueden clasificar en: catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos. Los fosfolípidos zwitteriónicos tienen cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes y pueden adquirir carga neta en función del pH de la solución en que se
35 encuentren.

En la presente invención, el término “tensioactivo” se refiere a compuestos sintéticos capaces de disminuir la tensión superficial de la interfase agua-aire y que exhiben una concentración micelar crítica, es decir forman micelas espontáneamente en agua. De acuerdo con la presente invención, el término tensioactivo no incluye fosfolípidos.

5 En la presente invención, el término “polímero” se refiere a un compuesto formado por la unión mediante enlaces covalentes de al menos cinco unidades simples llamadas monómeros. (sean éstos iguales o distintos entre sí).

10 El término “ácido graso” se refiere a un ácido monocarboxílico con una cadena hidrocarbonada lineal con un mínimo de 4 carbonos, y que puede ser saturada o insaturada.

15 El término “alcohol graso”, también denominado “alcohol de cadena larga”, se refiere a un hidrocarburo alifático que contiene al menos un grupo hidroxilo primario y que tiene una cadena hidrocarbonada lineal con un mínimo de 5 carbonos, y que puede ser saturada o insaturada.

En una realización preferida, el hidrogel de la presente invención consiste en:

- 20 - entre un 3% y un 30% en peso de lípidos, donde los lípidos comprenden al menos un fosfolípido zwitteriónico,
- entre un 70% y un 97% en peso de agua

En una realización preferida del hidrogel de la presente invención, la proporción en peso lípidos:agua es 5:95.

25

En una realización preferida, el fosfolípido zwitteriónico es seleccionado de la lista que comprende: fosfatidilcolinas, y fosfatidiletanolaminas. Más preferiblemente, el fosfolípido zwitteriónico es fosfatidilcolina de soja hidrogenada (abreviado como HSPC, de sus siglas en inglés, *Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine*, también denominada
30 *L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)*).

En una realización preferida, los lípidos comprenden, además del fosfolípido zwitteriónico, un lípido aniónico o catiónico. En este caso, la proporción molar entre el fosfolípido zwitteriónico y el lípido aniónico o catiónico está preferiblemente entre 100:1

y 3:1, más preferiblemente entre 80:1 y 3: 1 y aún más preferiblemente, la proporción molar es 20:1.

5 En una realización preferida, el lípido catiónico es 2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (abreviado como DOTAP, por sus siglas en inglés, *1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*).

10 En una realización preferida, el lípido aniónico es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (abreviado como DOPS, por sus siglas en inglés, *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine*).

En una realización preferida, el hidrogel comprende además un principio activo, como, por ejemplo, un esfingolípido, colesterol, un antioxidante, un fármaco (por ejemplo un antibiótico, un antiinflamatorio), una proteína o combinaciones de los mismos.

15

El término “principio activo” de acuerdo con la presente invención, se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta beneficiosamente a la estructura o función del cuerpo de un sujeto. Los principios activos que pueden estar comprendidos en el hidrogel de la presente invención pueden ser compuestos lipofílicos o hidrofílicos.

20

La proporción en peso del principio activo en el hidrogel puede variar entre el 0 y el 20% en peso con respecto al peso total del gel.

25

En una realización preferida, el hidrogel de la presente invención consiste en:

- entre un 3% y un 30% en peso de lípidos, donde los lípidos comprenden al menos un fosfolípido zwitteriónico,
- entre un 70% y un 97% en peso de agua
- 30 -entre un 0% y un 20% de principio activo.

La estructura y fluidez de los hidrogeles lipídicos de la presente invención responden de forma reversible a la temperatura y al pH y son capaces de transportar al menos una sustancia hidrofílica dentro de la piel y también a folículo. Su particular organización, con parte del agua atrapada en vesículas y estas vesículas atrapadas o

35

intercaladas entre láminas extendidas, los hace muy adecuados como sistemas para incorporar moléculas de diferente naturaleza polar en diferentes compartimentos. Su composición exclusivamente lipídica garantiza alta biocompatibilidad y su comportamiento reológico los hace fácilmente aplicables sobre la piel, los ojos o las mucosas.

Tal y como han demostrado los inventores en los ejemplos proporcionados, los hidrogeles descritos en la presente invención son estables en un rango de pH muy amplio, entre pH 2 y 13. Por ello, por ejemplo, se pueden emplear en aplicaciones gástricas donde el pH puede oscilar entre 1 y 4.

Además, los geles han demostrado ser estables en el tiempo, incluso sin necesidad de añadir aditivos, manteniendo su comportamiento reológico, ya que sus valores de módulo viscoso G'' y módulo elástico G' se mantienen inalterados en el tiempo.

Tal y como se ha comentado anteriormente, los hidrogeles de la presente invención presentan un comportamiento de gel, ya que su valor de módulo elástico G' es superior al valor del módulo viscoso G'' en un amplio rango de frecuencias.

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de preparación de un hidrogel lipídico nanoestructurado según se ha descrito en el primer aspecto de la invención que comprende las etapas de:

- dispersión de los lípidos en agua sin intervención de polímeros, tensoactivos, alcoholes grasos ni ácidos grasos,
- formación del hidrogel a partir de la dispersión lipídica obtenida en la etapa anterior caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo sin intervención de polímeros, tensoactivos, alcoholes grasos ni ácidos grasos, comprendiendo la formación del hidrogel las siguientes subetapas:
 - ajuste del pH de la dispersión lipídica entre 2 y 13, para que al menos uno de los lípidos presentes en la dispersión adquiera carga neta o mantenga su carga, bien sea positiva o negativa
 - congelación de la dispersión con pH ajustado a una temperatura igual o inferior a -20°C durante un periodo de tiempo de igual o superior a 1 minuto.
 - descongelación y calentamiento de la dispersión a una temperatura comprendida entre 5°C y 90°C ,
 - enfriamiento a temperatura ambiente de la dispersión gelificada procedente de la

etapa anterior.

La dispersión de los lípidos en agua se realiza preferiblemente mezclando los lípidos correspondientes en un disolvente orgánico a las concentraciones y relaciones
5 molares especificadas y evaporación del mismo en rotavapor seguido de desecación y posterior hidratación mediante adición del agua en el rango de concentraciones especificadas en condiciones de agitación y a temperatura ambiente.

El disolvente orgánico empleado puede ser cloroformo, metanol, etanol, mezclas de
10 los mismos, etc, dependiendo de los lípidos usados. Preferiblemente, el disolvente orgánico es cloroformo.

El ajuste del pH de la dispersión lipídica entre 2 y 13 se realiza mediante la adición de una solución ácida o básica, por ejemplo, con una solución de ácido clorhídrico o
15 hidróxido sódico.

El valor de pH al que se debe ajustar la dispersión para que al menos un lípido esté cargado es algo que el experto puede determinar fácilmente en función del lípido o lípidos presentes en la dispersión. Si hay lípido positivo se ajusta preferiblemente a pH
20 neutro o básico; si hay lípido negativo, se ajusta a neutro o ácido, de manera que así mantienen su carga. Si solo hay lípidos zwitteriónicos, el pH puede ajustarse a un pH tanto ácido como básico para que el lípido se ionice.

Por último, constituye un tercer aspecto de la invención el uso de un hidrogel descrito
25 en el primer aspecto de la invención como sistema de liberación de principios activos o como protector de piel y mucosas, más preferiblemente como protector gástrico.

La aplicación del hidrogel puede ser cutánea, mucosa u ocular, así como oral.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Fig. 1.** Imágenes de microscopía confocal de los geles HSPC/DOTAP, magnificaciones x10 (A, B y C) y x63 (D, E y F). Muestra 3:1 (A y D), muestra 20:1 (B y E) y muestra 80:1 (C y F). La señal de fluorescencia (zonas claras) surge de la fase lipídica debido a la incorporación de la sonda fluorescente y las zonas oscuras corresponden con el agua. Las flechas indican las estructuras laminares.

10 **Fig. 2.** Ampliación imagen gel HSPC/DOTAP 3:1. Las flechas indican las estructuras laminares.

Fig. 3. Estructura del gel HSPC/DOPS 20:1. Las flechas indican las estructuras laminares.

15

Fig. 1. Ensayo oscilatorio con barrido de frecuencia donde se compara un gel de HSPC/DOTAP con distintas relaciones molares.

20 **Fig. 5.** Ensayo oscilatorio con barrido de frecuencia donde se compara un gel de HSPC/DOTAP con un gel de HSPC/DOPS.

Fig. 2. Comportamiento reológico de los geles a distinto pH.

Fig. 7. Estabilidad de un gel de HSPC/DOPS 20:1 con el tiempo.

25

Fig. 3. Espectros de SAXS (A) y WAXS (B) de geles de HSPC/DOTAP a distintas relaciones molares

30 **Fig. 4.** Espectros de SAXS (A) y WAXS (B) de geles de HSPC/DOPS a distintas relaciones molares

35 **Fig. 10.** Muestra una imagen de microscopía confocal del hidrogel preparado en el ejemplo 1 con una composición lipídica HSPC/DOTAP del 5% en peso (relación molar HSPC/DOTAP 3:1) y 95% de agua. En dicha imagen se pueden observar las láminas y vesículas que forman la red tridimensional. En las zonas marcadas por un círculo se pueden apreciar las láminas plegadas entrelazadas con estructuras compatibles con

vesículas.

Fig. 11. Muestra una imagen de tres geles formados a distinto pH y/o composición: gel de HSPC a pH 11.5, un gel de HSPC a pH 2.5 y un gel de HSPC/DOPS 20:1 a pH 7. Los tres geles han sido formados a un 5% de concentración de lípido siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 1 de la presente invención. Se observa un comportamiento de gel rígido a simple vista ya que los geles no se mueven por el efecto de la gravedad dentro de los eppendorf.

Fig. 12. Muestra una imagen con tres geles de HSPC/DOTAP formados a 5% de lípido. Las relaciones molares HSPC/DOTAP son de 3:1, 20:1 y 80:1. Se ve como el gel 20:1 es el más rígido, mientras que el 3:1 fluye más fácilmente con el tiempo al girar el eppendorf. En la imagen también se muestran las diferencias en la estructura lipídica mediante microscopia confocal: el gris corresponde a los lípidos y el negro al agua.

Fig. 13. Simulación del proceso de digestión gástrica para un gel de HSPC/DOTAP a pH 2 de acuerdo con el ejemplo 5. En la imagen de la izquierda se puede ver el momento en que se añadieron 0.5 mL de gel a la solución ácida. En las fotos de la derecha se muestra el estado del gel después de 2 horas en agitación a 37 °C.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de hidrogeles lipídicos de acuerdo con la presente invención

Ejemplo 1.1.: Hidrogeles de composición HSPC/DOTAP con un 5% en peso total de lípidos y con proporciones molares HSPC/DOTAP 80:1, 20:1 y 3:1.

Materiales

Se adquirieron fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemania). El

cloroformo fue adquirido a Merck (Darmstadt, Alemania). 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DOPS) fue adquirido en Lipoid GmbH.

Preparación de los geles lipídicos

5 En primer lugar, se formó una dispersión acuosa de HSPC y DOTAP (la relación molar entre dichos lípidos se fijó en 3:1, 20:1 y 80:1) para ello los lípidos se disolvieron en cloroformo y seguidamente el disolvente fue evaporado mediante rotavapor para formar una película lipídica y se adicionó agua hasta tener una concentración total de lípidos del 5% en peso. A continuación, el pH se ajustó a 7 añadiendo una disolución
10 de NaOH al 0,1% en peso. Para formar los geles, la dispersión acuosa de lípidos se almacenó primero a -20 °C en un frasco cerrado durante dos horas para congelar completamente la muestra. Después, las muestras se calentaron a 70 °C durante 10 minutos hasta que toda la dispersión se aclaró. Los geles se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron 24h en la nevera (5°C) antes de cualquier
15 medición. La gelificación y la ausencia de separación de agua se confirmaron dando la vuelta a los viales.

Ejemplo 1.2.: Hidrogeles de composición HSPC/DOPS con un 5% en peso total del lípidos y con proporciones molares HSPC/DOPS 80:1, 20:1 y 3:1

20 Los hidrogeles de composición HSPC/DOPS se prepararon siguiendo la misma metodología que en el ejemplo 1.1., pero utilizando DOPS en lugar de DOTAP.

Ejemplo 1.3.: Hidrogel que comprende como lípido únicamente el fosfolípido HSPC al 5% en peso.

25 Este hidrogel se preparó como en los casos anteriores, pero utilizando únicamente HSPC como lípido y ajustando el pH a 2,5 en un caso y a 11,5 en otro (se prepararon dos geles de la misma composición a distintos pH).

30

Ejemplo 2.: Estudio de microscopia confocal de los geles

Esta técnica nos permite observar la microestructura del gel y cómo se organiza en el medio acuoso. Se puede detectar la formación de estructuras con distintas morfologías
35 y tamaños, así como la interconexión entre dichas estructuras en la matriz del gel.

Se realizaron ensayos de microscopía confocal de fluorescencia con los hidrogeles siguientes preparados en el ejemplo 1: HSPC/DOTAP en proporción 80:1, 20:1 y 3:1; y HSPC/DOPS en proporción 20:1.

5

2.1. Procedimiento del ensayo

Con el objetivo de marcar la parte lipídica de los geles se utilizó la sonda fluorescente 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA). La concentración final de la sonda fue 0,005% en peso en todas las muestras para tener suficiente intensidad fluorescente sin interferir en la estructura del gel.

Se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 880 equipado con un láser DPSS de 561 nm para excitación de la Rodamina B. Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo 10X 0.4NA y un objetivo 63X 1.4NA de inmersión en glicerol. Las imágenes se procesaron usando el software ImageJ 1.52d (J. Schindelin, et al. Nat. Methods. 9 (2012) 676).

15

2.2. Resultados y conclusiones

La organización de los lípidos formando la microestructura del gel de HSPC/DOTAP y HSPC/DOTAP se pueden ver en la Figura 1 y Figura 2 respectivamente. Los lípidos aparecen en escala de gris, mientras que el agua aparece de color negro.

20

En la Figura 1, las imágenes de menor magnificación (arriba) permiten ver como los lípidos se organizan en agregados interconectados ocupando gran parte del espacio, como es esperable en un gel. Las imágenes de mayor magnificación (abajo) muestran como esos dominios de lípidos están formados por agregados de láminas lipídicas (indicadas con flechas) y partículas esféricas tipo vesículas que rondan los 5 – 20 nm de diámetro.

25

La figura 2 muestra con más detalle la estructura del gel de HSPC/DOTAP 3:1 que aparece en la figura 3D. Aquí se aprecian claramente esas láminas y vesículas interconectadas.

30

En la figura 3 se muestra una imagen del gel de HSPC/DOPS 20:1 donde se aprecian también esas láminas y vesículas interconectadas.

Ejemplo 3. Estudio reológico de los geles

La reología permite describir las propiedades macroscópicas del gel. En el estudio reológico que describimos más abajo, se determina la respuesta del material a un estrés oscilatorio, determinando las variables módulo elástico (G') y módulo viscoso (G''). En los materiales que tienen un comportamiento gel la elasticidad, medida con G' , será mayor que la energía disipada o comportamiento viscoso, determinado por G'' para un rango de frecuencias determinado.

Se realizaron ensayos con los hidrogeles siguientes preparados en el ejemplo 1: HSPC/DOTAP en proporción 80:1, 20:1 y 3:1; y HSPC/DOPS en proporción 20:1

3.1. Procedimiento del ensayo

Se estudió el comportamiento reológico de los geles realizando ensayos oscilatorios con un reómetro de esfuerzo controlado AR-G2 (TA Instruments), equipado con un sistema de control de temperatura Peltier. Las mediciones fueron realizadas por la Unidad de Líquidos Nanoestructurados (U12) de CIBER-BBN, en el ICTS NANBIOSIS. Se utilizó geometría cono-placa de 40 mm de diámetro, ángulo de cono de 4° y un espacio de $105\ \mu\text{m}$. Las muestras se evaluaron a 25°C y se evitó el secado de las muestras utilizando una trampa de disolvente. Antes de cada medición oscilatoria, los geles se cortaron previamente a $10\ \text{s}^{-1}$ durante 10 s para obtener condiciones homogéneas. Luego, la muestra se sometió a una deformación por cizallamiento sinusoidal mientras se medía la respuesta al esfuerzo en cada punto. Los datos se analizaron utilizando el software TRIOS (TA Instruments, EE. UU.). El comportamiento viscoelástico de la muestra se describió mediante el módulo complejo $G^* = \tau/\gamma$, donde τ es el esfuerzo cortante y γ es la deformación cortante. Con el ángulo de fase δ entre la respuesta de oscilación aplicada y la resultante, el software determinó el módulo elástico G' y el módulo viscoso G'' del vector G^* de la siguiente manera:

$$G' = G^* \cos \delta$$

$$G'' = G^* \sin \delta$$

El módulo elástico G' está relacionado con la energía almacenada, mientras que el módulo viscoso G'' representa la energía disipada.

3.2. Resultados y conclusiones

En estos ensayos se mide el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') de la muestra aplicando una deformación fija en un intervalo de frecuencias. De este modo

se puede ver cómo se comporta el material en función del tiempo que dura la deformación aplicada.

3.2.1. Prueba del comportamiento gel

En las figuras 4 y 5 se puede ver que, en todos los geles, el modulo elástico (G') es superior al viscoso (G'') en todo el rango de frecuencias. Esto es indicativo que el material tiene un comportamiento macroscópico de tipo gel. Como es esperable en estos materiales, G' y G'' aumentan a frecuencias altas (deformaciones rápidas) ya que la estructura interna de la muestra tiene menos tiempo para adaptarse a la deformación aplicada y por lo tanto hay una mayor resistencia a esta.

En la Tabla 1 se muestran las diferencias en los valores de G' y G'' de la Figura 5 para los geles de HSPC/DOPS y HSPC/DOTAP en relación molar 20:1. Se ve como el gel de DOTAP es el más resistente a la deformación, ya que presenta unos valores de G' y G'' mayores. Así mismo, el gel de DOTAP tiene un ángulo de fase (ratio G''/G') menor a frecuencias bajas, indicando un mayor predominio del comportamiento elástico de la estructura en comparación con el gel de DOPS. De este modo se puede deducir que, en función de la composición lipídica utilizada, se pueden obtener geles con propiedades reológicas distintas, manteniendo una estructura formada por vesículas y láminas interconectadas. Este hecho permite una gran versatilidad de aplicación, ya que es posible preparar materiales de diferente comportamiento reológico en función del uso final. Además, se ha comprobado que, utilizando las composiciones lipídicas mencionadas, no es necesaria la presencia de otro tipo de moléculas para la obtención del gel.

Tabla 1. Valores de G' y G'' de distintos geles en función de la frecuencia

		Frecuencia	
		0, 1 rad/s	100 rad/s
HSPC/DOTAP	G' (Pa)	1500	6900
	G'' (Pa)	733	1700
	Angulo de fase ($^{\circ}$)	26	13,8
HSPC/DOPS	G' (Pa)	550	2600
	G'' (Pa)	390	615

	Angulo de fase (°)	35	13,3
--	--------------------	----	------

3.2.2. Estabilidad con el pH

El mismo comportamiento de gel se puede observar en la Figura 6 cuando los geles son preparados a pH ácido, neutro y básico (3, 6,5 y 10,5 respectivamente). Las diferentes combinaciones que han sido probadas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Distintas composiciones de geles con su rango de estabilidad frente al pH

Composición lipídica (5% en peso)	Rel. Molar	Rango de pH estable
HSPC	1	2 – 5 y 9 – 12
HSPC/DOTAP	80:1	2 – 9
	20:1	
	3:1	
HSPC/DOPS	80:1	5 – 12
	20:1	
	3:1	

3.2.3. Estabilidad con el tiempo

Con relación a la estabilidad, se ha comprobado que estos geles son estables a lo largo del tiempo. La figura 7 muestra como el mismo comportamiento reológico de gel se mantiene al cabo de 3 meses en un gel de HSPC/DOTAP 20:1 guardado a 5 °C en un recipiente hermético.

15 Ejemplo 4. Estudios de dispersión de rayos X

La dispersión de rayos X es una técnica analítica que mide las intensidades de rayos X dispersados en una muestra en función del ángulo de dispersión. A partir de la ley de Bragg, se entiende que con la disminución del ángulo de dispersión, se analizan características estructurales cada vez más grandes.

Se observa una señal a ángulos pequeños en ingles SAXS (Small Angle X-ray Scattering) cuando el material contiene características estructurales en la escala de nanómetros, generalmente, en el rango de entre 1 y 100 nm. Por otra parte, la dispersión de rayos X de ángulo amplio, en ingles WAXS (Wide Angle X-ray Scattering), analiza las estructuras en el material en una escala de longitud mucho más pequeña como distancias interatómicas y menores.

En nuestros experimentos estas técnicas nos permiten detectar la nanoestructura de la bicapa lipídica de las láminas y vesículas que forman el gel (SAXS) así como el empaquetamiento lateral entre los lípidos (WAXS).

10 Se realizaron ensayos con los hidrogeles siguientes preparados en el ejemplo 1: HSPC/DOTAP en proporción 80:1, 20:1 y 3:1 y HSPC/DOPS en proporción 80:1, 20:1 y 3:1.

4.1. Procedimiento del ensayo

Las medidas de dispersión de rayos X se realizaron con radiación de sincrotrón en la línea de luz BL11-NCD-SWEET del ALBA (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España). Las muestras se cargaron en un capilar de vidrio de 1,5 mm y se colocaron en una cámara Linkam, que se utiliza para controlar la temperatura a 25°C. Las muestras se alinearon con el haz de rayos X con una energía de 12,4 keV. Las medidas a ángulo pequeño (SAXS) se adquirieron utilizando un detector Pilatus 1M colocado a 2,71 m de la muestra y las de ángulo ancho (WAXS) se adquirieron utilizando un detector Rayonix LX255-HS colocado a 0,134 m. Los espectros se recogieron con un tiempo de adquisición de 5s.

4.2. Resultados y conclusiones

Con tal de estudiar la organización de la estructura lipídica a nivel molecular se utilizó una técnica de dispersión de rayos X mediante radiación de sincrotrón. En la Figura 8 y la Figura 9 se puede ver el patrón de dispersión a ángulos pequeños (SAXS) y grandes (WAXS) de los geles de HSPC/DOTAP y HSPC/DOPS respectivamente. Las relaciones molares utilizadas han sido 80:1, 20:1 y 3:1.

Se puede apreciar como el patrón de SAXS (Fig 8A y Fig 9A) tiene una banda principal centrada en $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ seguida por dos armónicos muy pequeños situados sobre $q = 2,4$ y $3,6 \text{ nm}^{-1}$. Este tipo de patrón es característico de sistemas formados por bicapas lipídicas con muy poca correlación. Así este patrón de dispersión es compatible con un

sistema formado mayoritariamente por vesículas unilamelares y láminas lipídicas donde la distancia entre bicapas es variable entorno a los 6 nm. Si por el contrario fuese un sistema multilamelar, donde la mayoría de lípidos están organizados en bicapas poco separadas con distancias regulares entre ellas, se obtendría un patrón
5 de dispersión con bandas estrechas y equidistantes.

El patrón de WAXS permite estudiar el empaquetamiento lateral de las moléculas que forman las bicapas lipídicas. En las Figuras 8B y 9B se puede ver en el espectro una pequeña banda centrada en 15 nm^{-1} correspondiente a una separación lateral entre moléculas lipídicas de 4,2 nm, que correspondería con un empaquetamiento
10 ortorrómbico o hexagonal. Es importante mencionar que la banda ancha de poca intensidad que aparece sobre $20\text{-}22 \text{ nm}^{-1}$ se debe probablemente a la señal producida por el agua de la muestra y por lo tanto no debe ser considerada.

Ejemplo 5. Ensayos de estabilidad gástrica

15

La capacidad de los geles de ser estables a distintos pH, incluso ácidos y básicos extremos, permite un rango aplicativo muy amplio. Por ejemplo, se pueden emplear en aplicaciones gástricas donde el pH puede oscilar entre 1 y 4. El gel HSPC/DOTAP 20:1 se sometió a una incubación que simulaba la digestión gástrica. En este ensayo
20 se preparó una solución salina a pH 2 con HCl y NaCl y a continuación se añadió el gel, que se dejó agitando en vaivén a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Se observó (Figura 13) cómo una parte del gel se rompió en fragmentos más pequeños a causa de la agitación, pero sin disolverse y manteniendo la apariencia de gel. Esto permitiría el uso de gel como agente de administración controlada de fármacos o como potencial
25 protector gástrico.

REIVINDICACIONES

- 1.- Hidrogel lipídico nanoestructurado formado por red tridimensional de láminas y
5 vesículas interconectadas, caracterizado porque comprende:
- entre un 3% y un 30% en peso de lípidos, donde los lípidos comprenden al menos
un fosfolípido zwitteriónico,
- entre un 70% y un 97% en peso de agua
y donde el hidrogel no comprende polímeros, tensoactivos, ácidos grasos, ni alcoholes
10 grasos.
- 2.- Hidrogel lipídico según la reivindicación 1, donde el fosfolípido zwitteriónico es
seleccionado de la lista que comprende: fosfatidilcolinas, y fosfatidiletanolaminas.
- 15 3.- Hidrogel lipídico según la reivindicación 2, donde el fosfolípido zwitteriónico es
fosfatidilcolina de soja hidrogenada.
- 4.- Hidrogel lipídico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, donde
los lípidos comprenden, además del fosfolípido zwitteriónico, un lípido aniónico o
20 catiónico.
- 5.- Hidrogel lipídico según la reivindicación 4, donde la proporción molar entre el
fosfolípido zwitteriónico y el lípido aniónico o catiónico está entre 100:1 y 3: 1
- 25 6.- Hidrogel lipídico según la reivindicación 5, donde la proporción molar entre el
fosfolípido zwitteriónico y el lípido aniónico o catiónico es 20:1.
- 7.- Hidrogel lipídico, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el lípido
catiónico es 2-dioleoil-3-trimetilamonio propano.
30
- 8.- Hidrogel lipídico, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el lípido
aniónico es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina.
- 9.- Hidrogel lipídico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende
35 además un principio activo.

10.- Hidrogel lipídico, según la reivindicación 9, donde el principio activo es un esfingolípido, colesterol, un antioxidante, un antibiótico, un antiinflamatorio, una proteína o combinaciones de los mismos.

5

11.- Hidrogel lipídico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado donde la proporción en peso lípidos:agua es 5:95.

12.- Procedimiento de preparación de un hidrogel lipídico nanoestructurado según se define en las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de:

10

- dispersión de los lípidos en agua sin intervención de polímeros, tensoactivos, alcoholes grasos ni ácidos grasos,

- formación del hidrogel a partir de la dispersión lipídica obtenida en la etapa anterior caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo sin intervención de polímeros,

15

tensoactivos, alcoholes grasos ni ácidos grasos, comprendiendo la formación del hidrogel las siguientes subetapas:

- ajuste del pH de la dispersión lipídica entre 2 y 13,

- congelación de la dispersión con pH ajustado a una temperatura igual o inferior a -20°C durante un periodo de tiempo de igual o superior a 1 minuto.

20

- descongelación y calentamiento de la dispersión a una temperatura comprendida entre 5°C y 90°C,

- enfriamiento a temperatura ambiente de la dispersión gelificada procedente de la etapa anterior.

25

13.- Procedimiento de preparación de un hidrogel lipídico según la reivindicación 12, donde la dispersión de los lípidos en agua se realiza mezclando los lípidos correspondientes en un disolvente orgánico y evaporación del mismo en rotavapor seguido de desecación y posterior hidratación mediante adición del agua en el rango de concentraciones especificadas en condiciones de agitación y a temperatura ambiente.

30

14.- Procedimiento de preparación de un hidrogel lipídico según las reivindicaciones 12 o 13, donde el disolvente orgánico es cloroformo.

15.- Procedimiento de preparación de un hidrogel lipídico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 donde el ajuste del pH de la dispersión lipídica se realiza con una solución de hidróxido sódico o ácido clorhídrico.

5 16.- Uso de un hidrogel lipídico nanoestructurado según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la liberación de principios activos o como protector de piel y mucosas.

17.- Uso, según reivindicación 16, como protector gástrico.

10

18.- Uso, según reivindicación 16 o 17, mediante aplicación cutánea, mucosa, ocular o mediante administración oral.

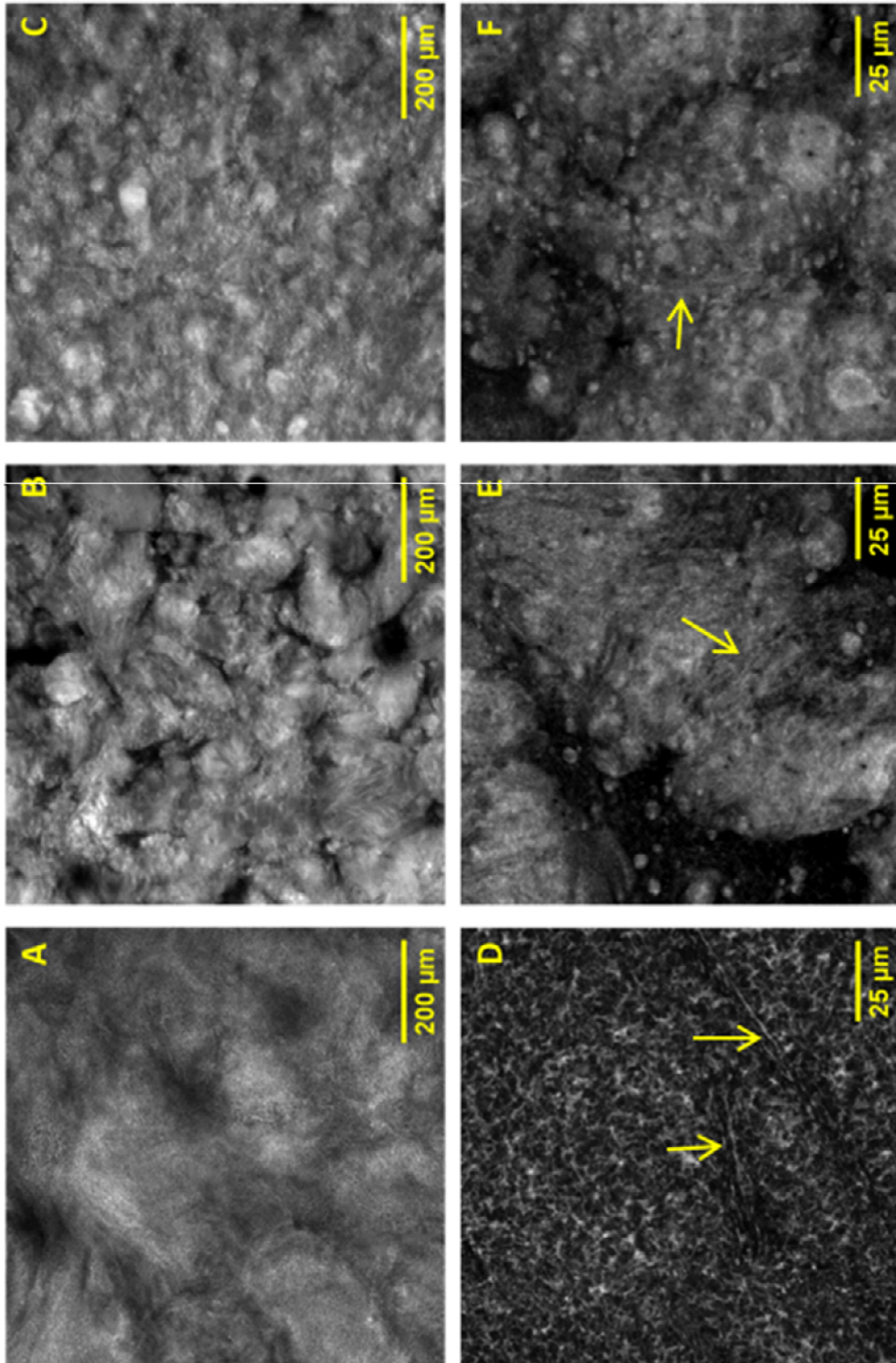


FIG. 1

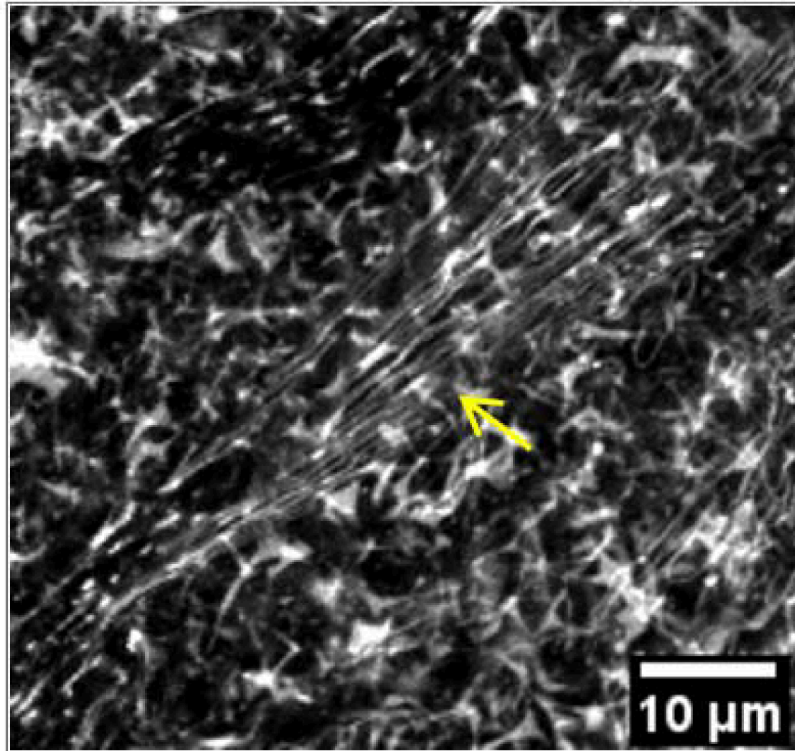


FIG. 2

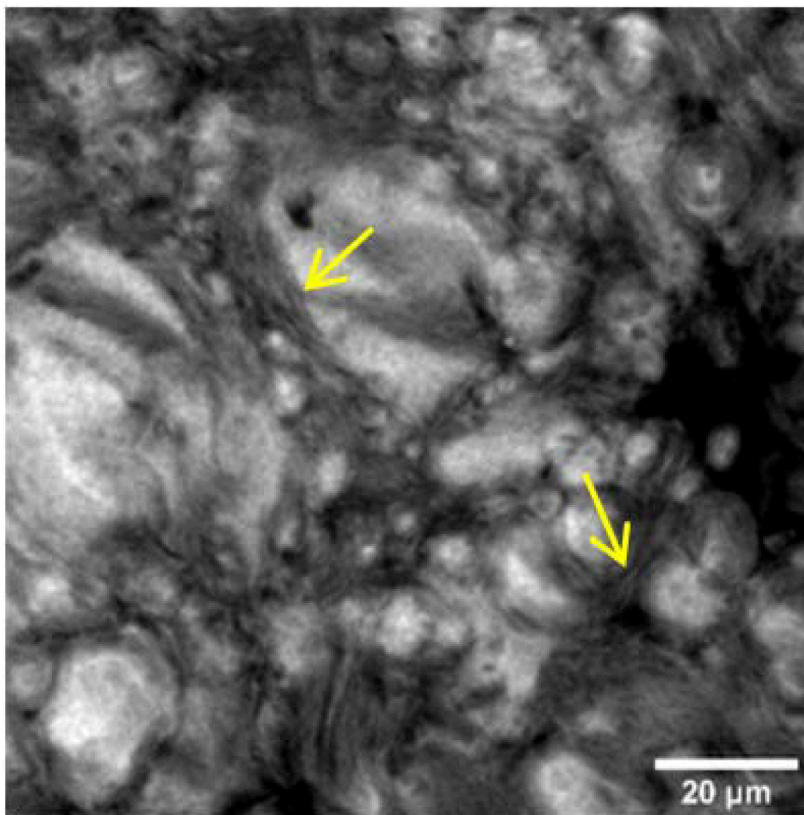


FIG. 3

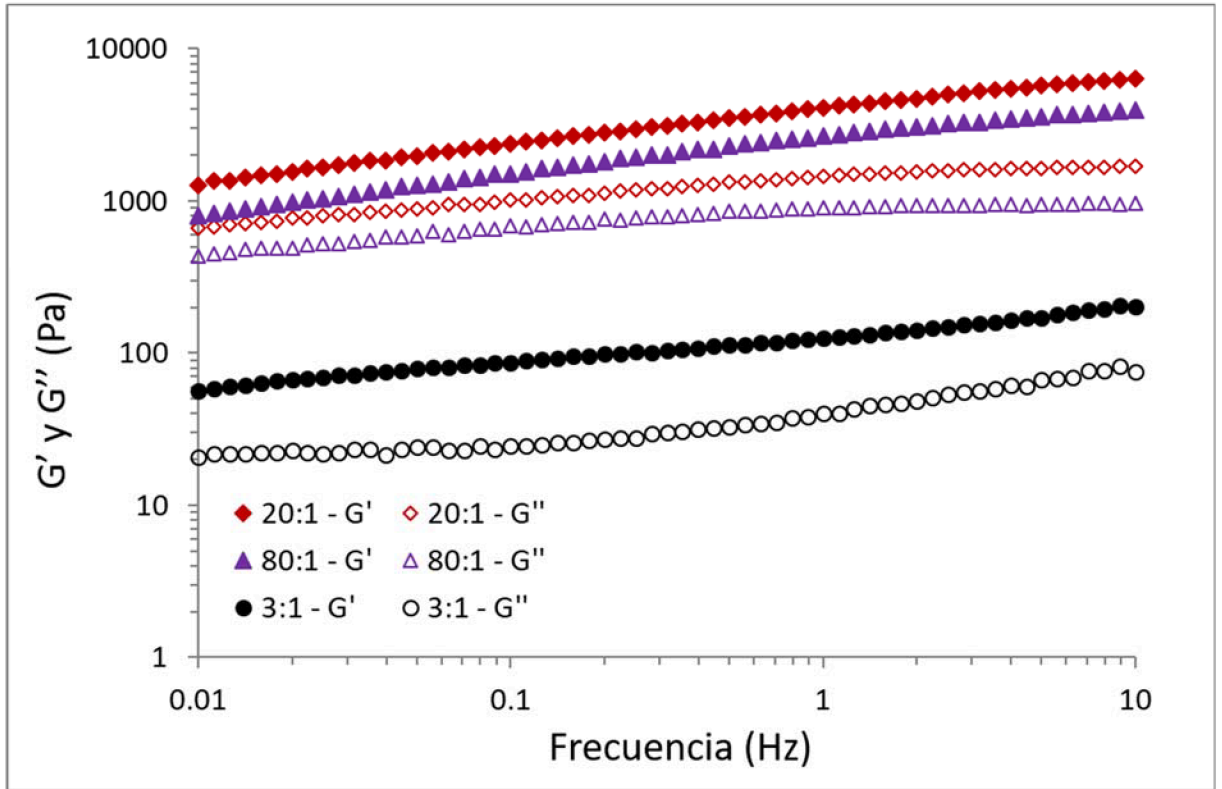


FIG. 4

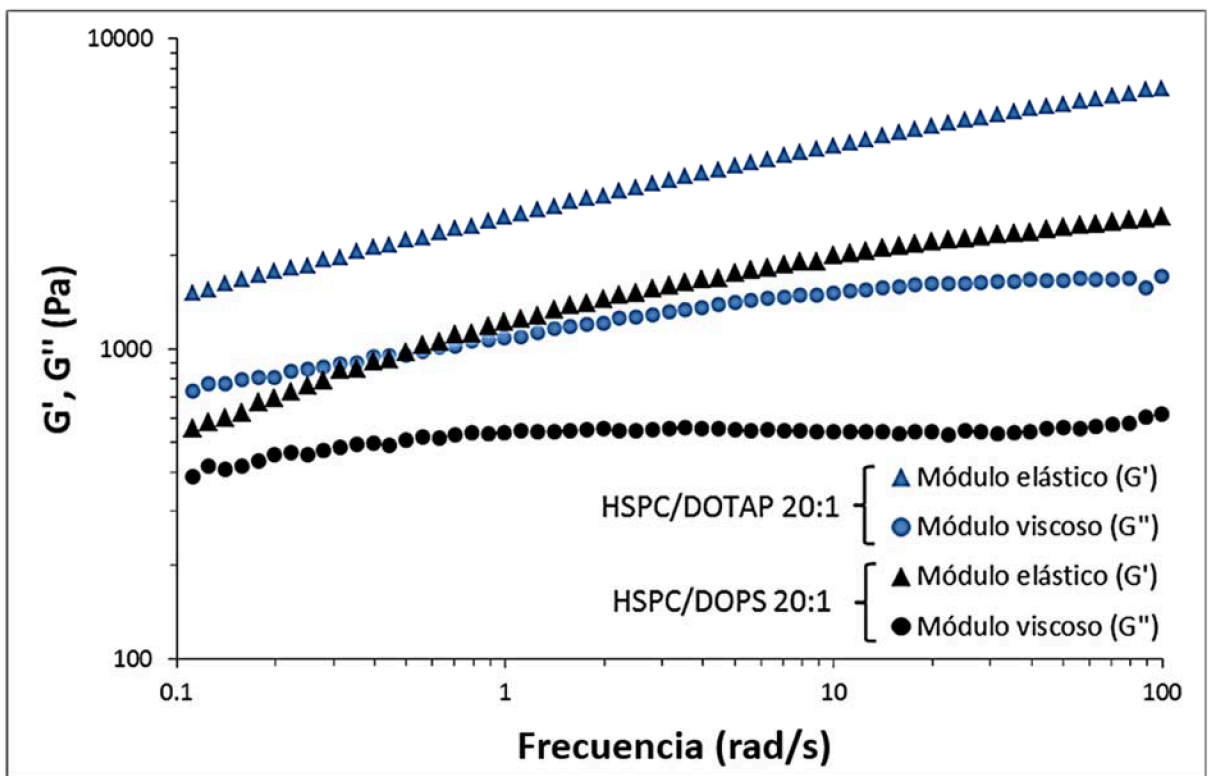


FIG. 5

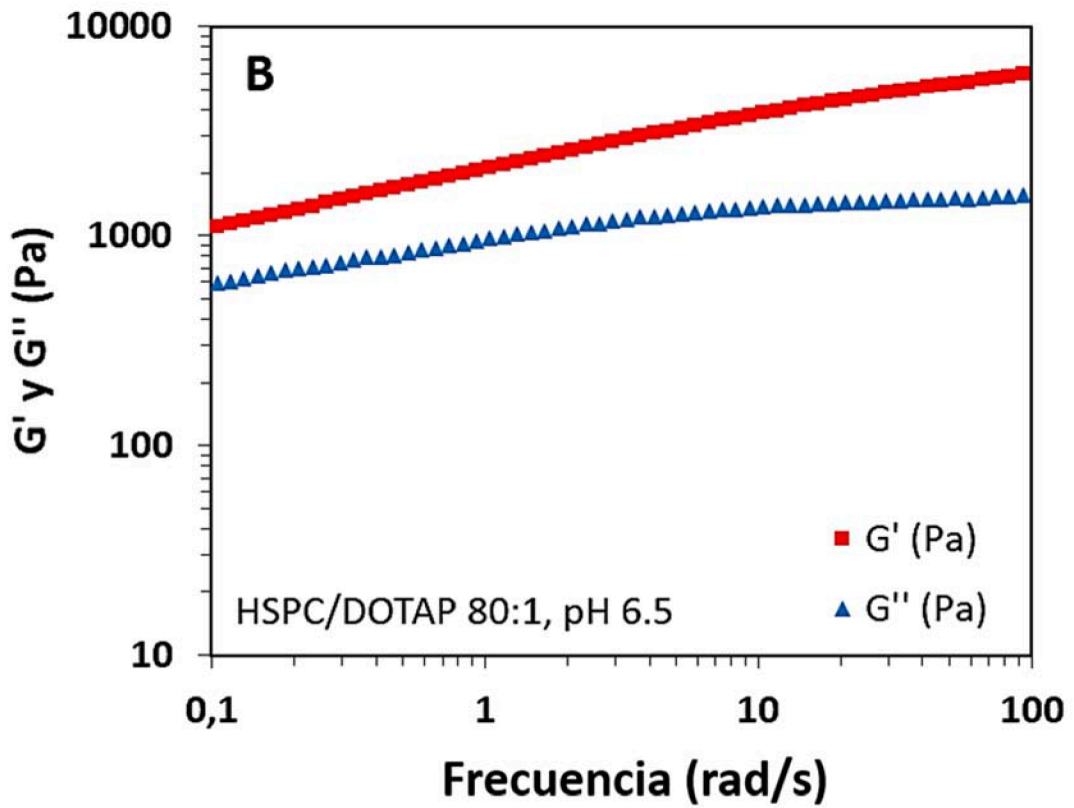
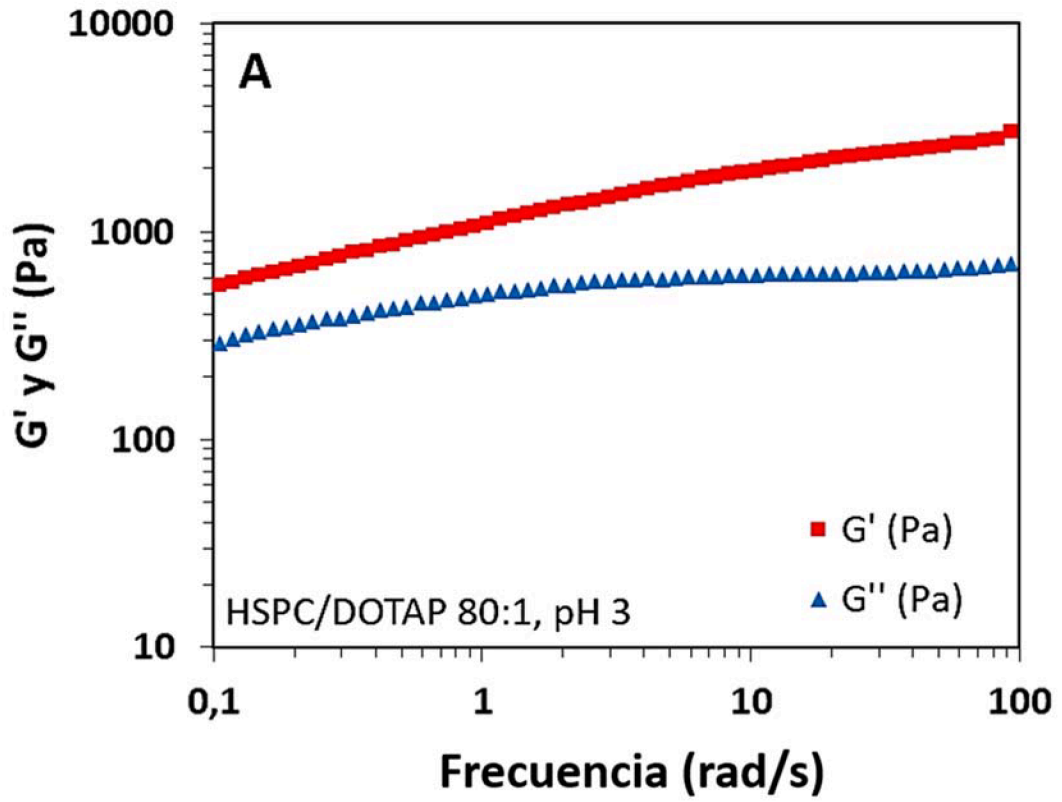


FIG. 6

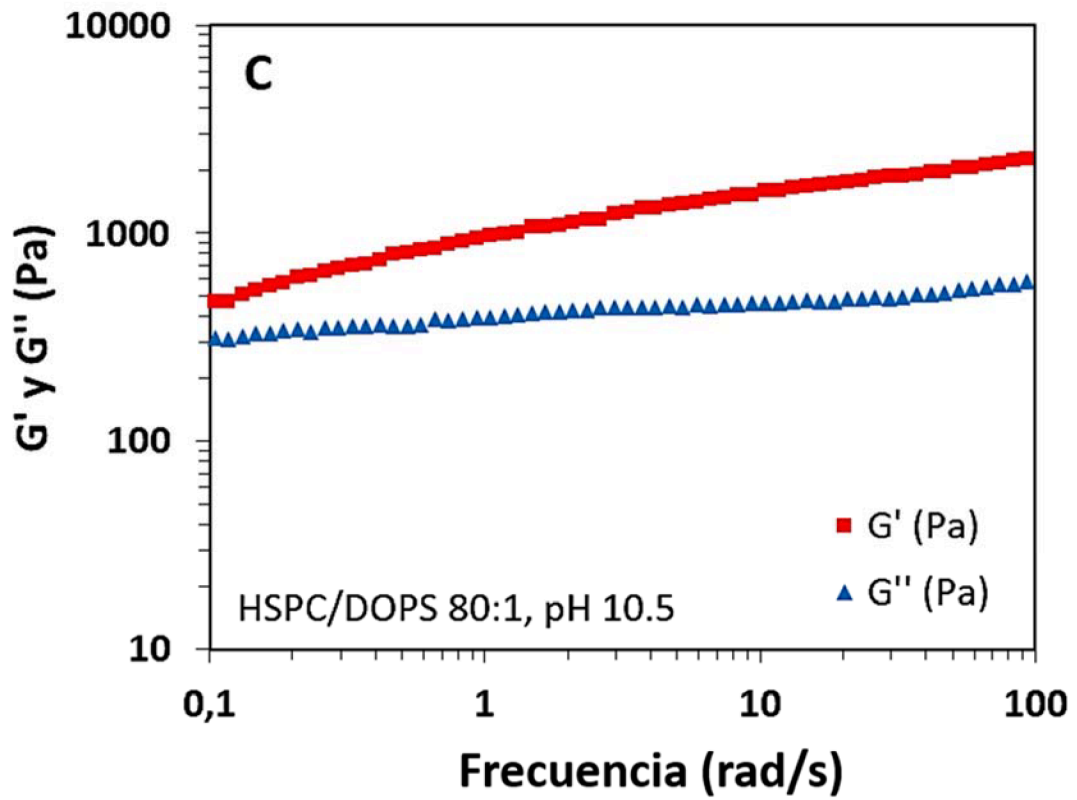


FIG. 6 cont.

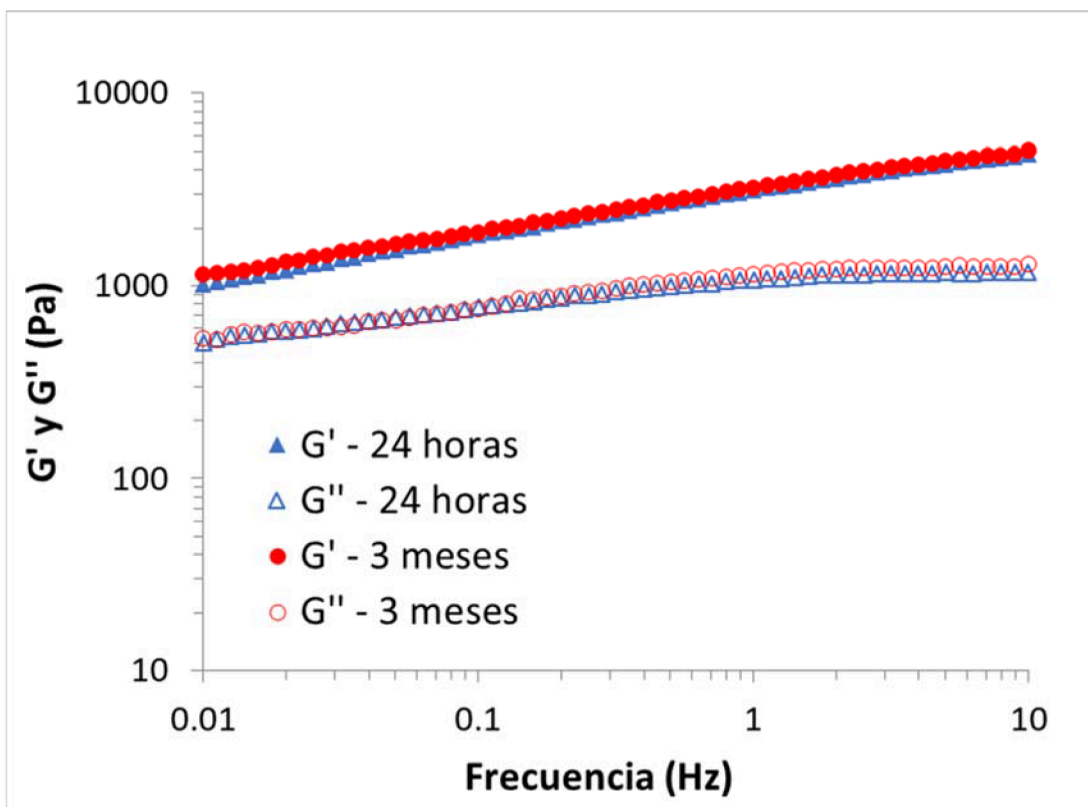


FIG. 7

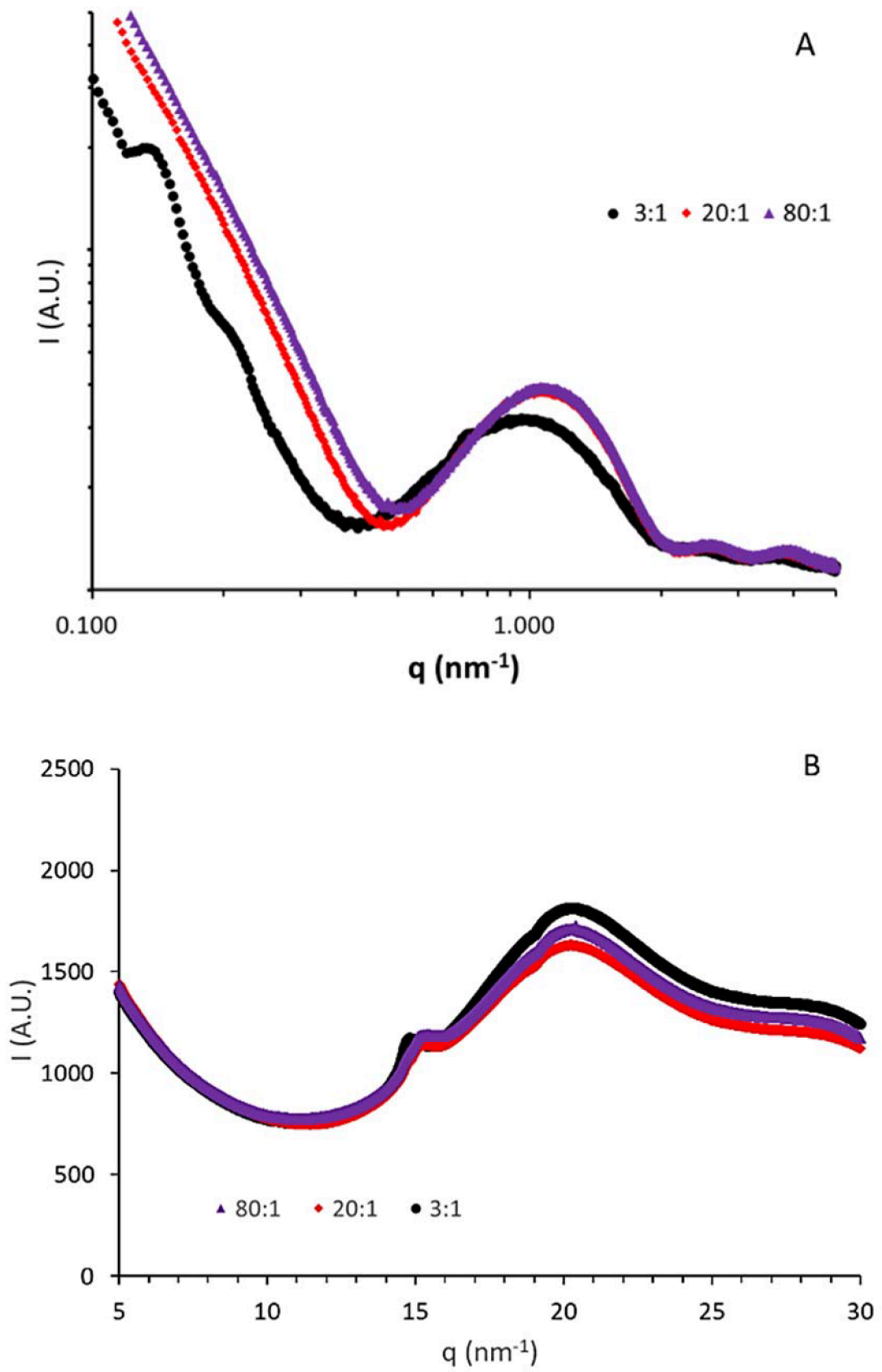


FIG. 8

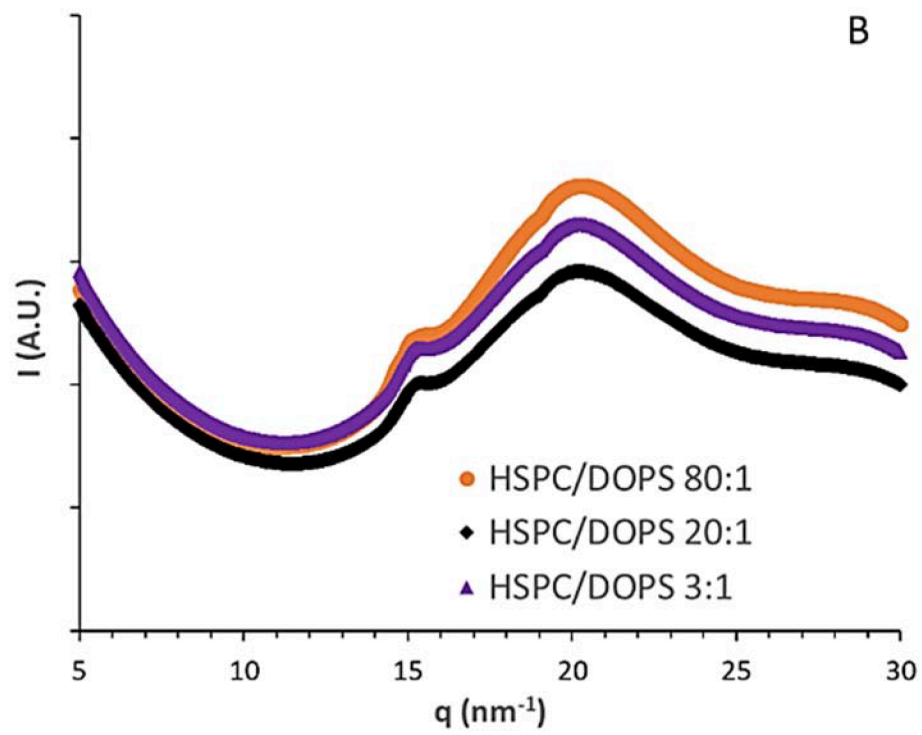
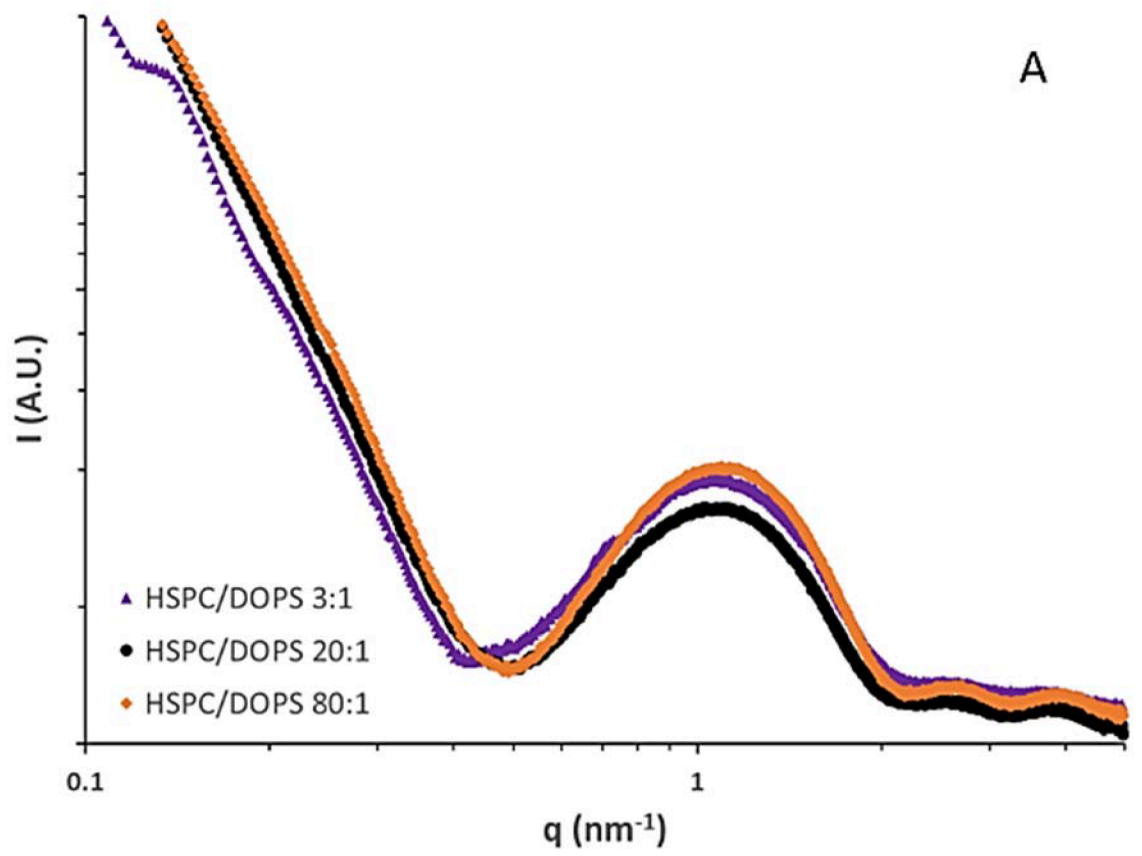


FIG. 9

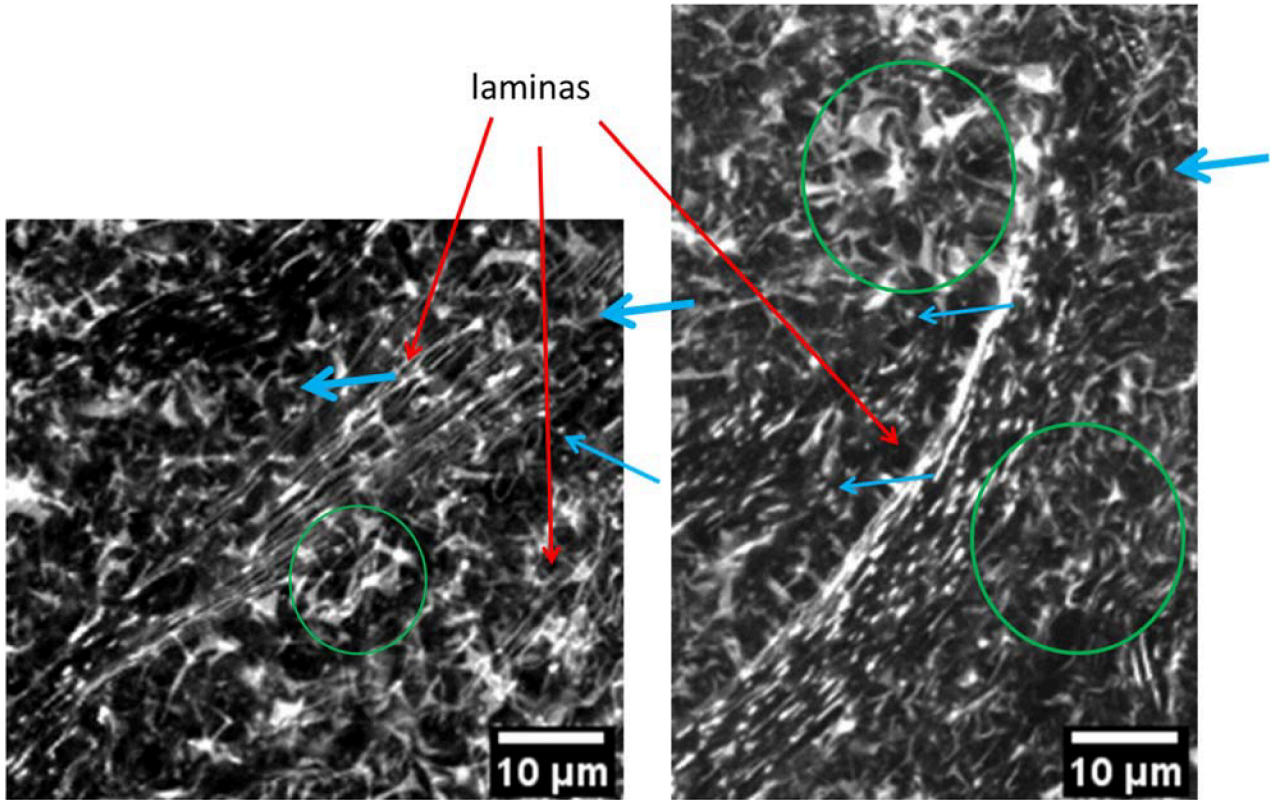


FIG. 10



FIG. 11

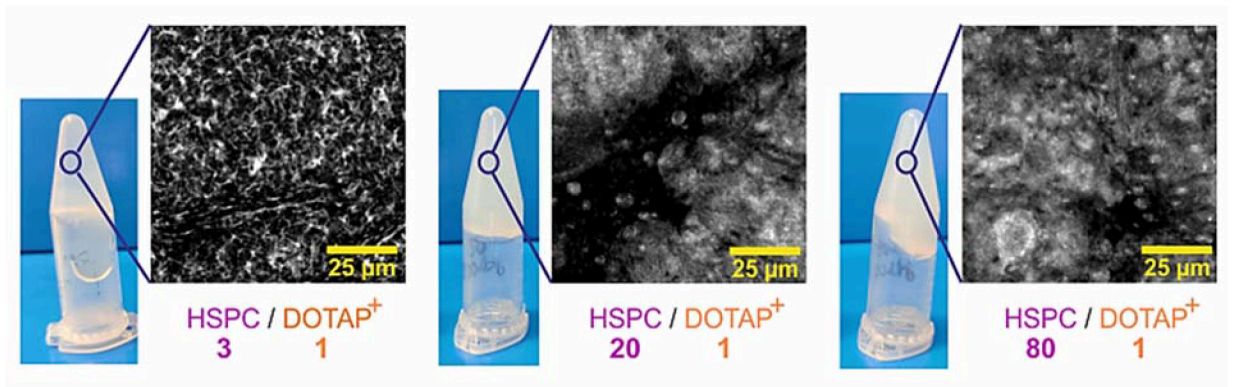


FIG. 12

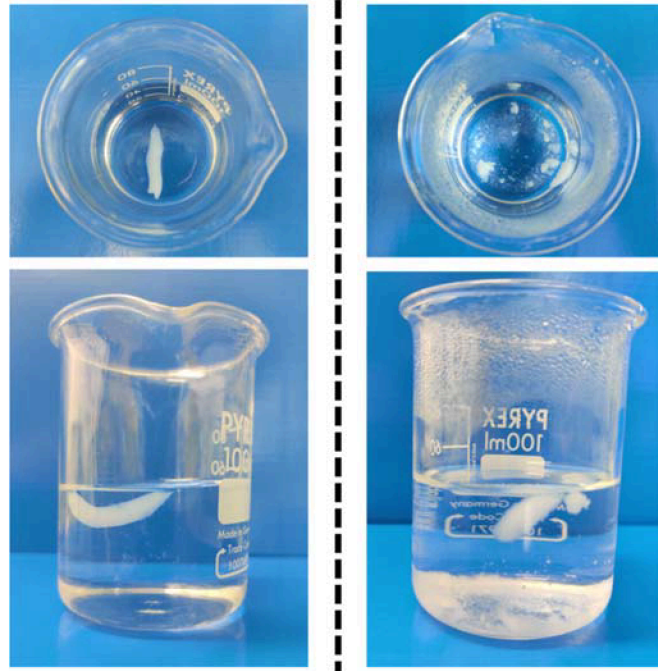


FIG. 13



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202031135

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2020

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2754476 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 17/04/2020; todo el documento.	1-18
A	EP 2210589 A1 (UNIV MUENCHEN, MAXIMILIANS LUDWIG) 28/07/2010; párrafos [0063], [0064], [0098]- [0105]; ejemplos, Figuras 6, 7.	1-18
A	US 2012141565 A1 (ZARU MARCO <i>et al.</i>) 07/06/2012; párrafos [0023], [0024]; Tabla 1; ejemplo 1.	1-18
A	WO 2019133916 A1 (UNIV WAYNE STATE) 04/07/2019; párrafos [0049], [0071]- [0075]; ejemplos 1-6.	1-18
A	SMITH E A <i>et al.</i> ; The interdigitated gel phase in mixtures of cationic and zwitterionic phospholipids. Biophysical Chemistry 20150101 Elsevier B.V. nld., 01/01/2015, Vol. 196, Páginas 86 - 91, ISSN 0301-4622 (print) ISSN 1873-4200 (electronic), <DOI: doi:10.1016/j.bpc.2014.10.003 pubmed:25451682>	1-18
A	CAMPBELL R B <i>et al.</i> ; Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. Biochimica et Biophysica Acta, 20010502 ELSEVIER, NL., 02/05/2001, Vol. 1512, Páginas 27 - 39, ISSN 0006-3002, <DOI: doi:10.1016/S0005-2736(01)00290-5>	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.06.2021

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/06 (2006.01)

A61K9/107 (2006.01)

A61K47/24 (2006.01)

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

A61K

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

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