



TÍTULO DE PATENTE No. 403118

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Domicilio: Av. Normalistas 800, Col. Colinas de La Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: NANOSISTEMA DE LIBERACIÓN DE COMPUESTOS HIDROFÓBICOS ACTIVOS CONTRA CÉLULAS TUMORALES.

Clasificación: **CIP:** A61K9/51; A61K31/05; A61K31/12; A61K31/165; A61K47/36; A61P35/00; A61K36/81; A61K36/9066
CPC: A61K9/51; A61K31/05; A61K31/12; A61K31/165; A61K47/36; A61P35/00; A61K36/81; A61K36/9066

Inventor(es): INOCENCIO HIGUERA CIAPARA; EVELIN MARTÍNEZ BENAVIDEZ; SARA ELISA HERRERA RODRÍGUEZ; OFELIA YADIRA LUGO MELCHOR

SOLICITUD

Número:
MX/a/2018/014048

Fecha de Presentación:
15 de Noviembre de 2018

Hora:
15:24

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 15 de noviembre de 2038

Fecha de Expedición: 5 de junio de 2023

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/imp. Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:

EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION TRIBUTARIA|56||MX/2023/53758|MX/a/2018/014048|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s) 1|sgbxBZ0ABTfdWawcVKg1nYtwvFU=

Sello Digital:

I4y+3i7VMQaQXYWcGdUM8q5y1N4vy5IEaNBK5bM5mfG4PMwsocyYk223eJzCsGyqkS+F1rBPW/8xDylepCBFQUrJ6k8umqdQjFF+NVF6XZQbsBYju9458HKQtN16Es0YdEgg5DUOpyY8g8nuCztO82id4PyJ5tT/e9/AkGNotTaywDoHGdq65QKviTkbPgaOhrJIPEJDIGVrqQ6hosNmVh+ETLuQ+YKRooMWEpy+0LBkPrH3YWAHTJEzKCi1xQcZMJeHtni33iqxT2zsusJe5s0+Fvydg+DZ88Qnht6Of2HQ9bU5qh+F6QDHW0UxehAFJSG3NW1xSnCgT565vA1cA==



MX/2023/53758

Nanosistema de liberación de compuestos hidrofóbicos activos contra células tumorales

Campo de la Invención

- 5 La presente invención corresponde al campo técnico de la nanomedicina y la terapia contra el cáncer, particularmente, la invención se refiere a un nanosistema que comprende nanocápsulas de quitosano modificado para la liberación de compuestos activos contra tumores del sistema nervioso central (SNC).

10 Antecedentes

Los gliomas son los tumores más comunes del sistema nervioso central (SNC), pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de célula en astrocitomas (astrocitos), oligodendrogliomas (oligodendrocitos) y ependimomas (ependimarias); y de acuerdo con el grado pueden ser caracterizados por bajo grado (grado II), alto grado o glioma maligno (grado III y IV). La forma de glioma más agresiva es el glioblastoma multiforme (GBM) (grado IV) y se caracterizan por una proliferación incontrolada, áreas de necrosis e infiltración difusa. La terapia estándar contra los gliomas malignos incluye cirugía, radiación y quimioterapia, o la combinación de éstas. Sin embargo, la quimiorresistencia es uno de los principales problemas en la terapia del glioma, por lo

15 que diversos intentos se han realizado para buscar compuestos activos con mayor eficacia que logren atravesar la barrera hematoencefálica para llevar a cabo su acción. Así, el diseño de sistemas de liberación a través de nanopartículas surge como una herramienta con enorme potencial en este campo (Glaser *et al.*, 2017; Suk, 2012).

La búsqueda de compuestos activos más efectivos contra las células tumorales, mediante los que se logre superar la quimiorresistencia se torna más compleja dado

25 que como es conocido, los gliomas, más particularmente los glioblastomas tienden a mostrar una heterogeneidad característica, siendo así que los sitios blanco a elegir son más bien pocos, y no se tiene la seguridad de que estarán presentes en todos los pacientes (Tutt B., 2017).

Se ha encontrado que la capsaicina (CP) es una molécula promisorio en el tratamiento contra los gliomas. Este tipo de capsaicinoides son moléculas de gran relevancia farmacológica debido a sus aplicaciones terapéuticas en contra del dolor y la inflamación. También se ha demostrado que induce apoptosis en varias células cancerígenas (páncreas, pulmón, próstata) incluyendo células de glioblastoma multiforme (Pramanik *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2010, Mori *et al.*, 2006, Amantini *et al.*, 2007, Jeon *et al.*, 2012).

Por ejemplo, Gil y Kang (2008) evaluaron su efecto en la inhibición y diferenciación celular en la línea de glioblastoma A-172, sus resultados indican que la CP induce la apoptosis a través de la cascada de caspasas mediada por mitocondria vía regulación negativa de Bcl-2 y regulación positiva de Bax. Además, se observó que CP incrementa los niveles de caspasa-3 y 9. Se conoce que la activación de caspasa-3 juega un papel clave en fase la ejecución de la apoptosis y es frecuentemente precedida por Bcl-2, Bax y caspasa-9 a través de la vía mitocondrial. Además, se demostró que la CP induce diferenciación terminal a través de la regulación de la expresión de genes relacionados con la diferenciación terminal. Por otra parte, Jeon *et al.*, (2012) demostraron que la CP induce inhibición en la viabilidad celular de células de glioma humano U87MG. Los mecanismos de apoptosis estaban relacionados con la vía mitocondrial (Bcl-2/Bax) y activación de la vía MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos), esta última involucrada en la muerte celular de varias células cancerígenas.

Otro estudio mostró que la CP puede inducir tanto apoptosis y autofagia en células de glioblastoma U251. En este trabajo se estudió la expresión de P53, el cual es un importante gen supresor de tumores, involucrado en la apoptosis. Por lo tanto, los agentes que inhiben la autofagia podrían ser combinados con capsaicina para el tratamiento antitumoral (Liu *et al.*, 2016). Un estudio más, realizado por Kim *et al.*, (2010) demostró que la CP es un potente sensibilizador de la apoptosis inducida por el ligando inducido por TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) en diferentes líneas celulares de glioma maligno (U87MG, U343, T98, SNU-44, U251N y U251MG). Por otro lado, Xie *et al.*, (2016) probaron que los efectos inductores de apoptosis de CP y dihidrocapsaicina en células U251 se asocian con la generación de especies reactivas de oxígeno, concentraciones aumentadas de Ca²⁺, despolarización

mitocondrial, liberación de citocromo C en el citosol resultando en la activación de caspasa-9 y -3.

Otra sustancia prometedora para ser utilizada en los tratamientos contra los gliomas es la curcumina (CUR), que es el principal curcuminoide de la cúrcuma (*Curcuma longa* Linn). En previos estudios se ha demostrado que la CUR presenta actividades como antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora y antidiabética. Además, existen diversos estudios que demuestran que la curcumina inhibe el crecimiento de células tumorales de varios cánceres humanos, incluyendo gliomas, reguladas por varios blancos moleculares y vías de señalización (He *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2013). Por ejemplo, Wang *et al.*, 2015 evaluaron la capacidad que tiene curcumina para inhibir el crecimiento de células de glioblastoma (U251 y SNB19) mediante la supresión de Skp2, lo que lleva a la inhibición del crecimiento celular, la invasión, la inducción de la apoptosis y el arresto del ciclo celular. Zhao y colaboradores 2017, evaluaron el efecto combinado con quimioterapéuticos (clorhidrato de nimustina) en células de glioblastoma, U118MG, U87MG y U251MG.

Además, en el documento de patente WO2009/073050, se describen composiciones y métodos de uso de CUR o derivados de CUR o análogos para disminuir el crecimiento de células cancerosas, disminuir el tamaño del tumor, prevenir la formación de tumores y para reducir o prevenir la invasión o metástasis de células tumorales.

Así, la potencial efectividad de la CP y de la CUR para inhibir el crecimiento de células de glioblastoma, enfrenta limitaciones como escasa biodisponibilidad incluyendo una absorción deficiente, un metabolismo rápido y una rápida eliminación sistémica lo que limita su aplicación para estos fines, por lo que se ha buscado desarrollar sistemas de liberación más eficientes que permitan mejorar solubilidad y estabilidad de estos compuestos a fin de mejorar su eficacia y reducir efectos secundarios no deseados. En este sentido, los sistemas nanoestructurados abren la posibilidad de una administración dirigida y mayor biodisponibilidad a través de las células.

En la literatura se ha descrito que el uso de nanocápsulas de metoxipolietilenglicol-policaprolactona (mPEG-PCL) unidas a CP contra células de glioblastoma humano (U251). En este estudio se demostró que la eficacia de las nanopartículas cargadas de

CP contra las células tumorales fue significativamente superior a la CP libre, especialmente a bajas concentraciones, además, se evaluó la capacidad de las nanopartículas cargadas con isotiocianato NIR-797 para atravesar la barrera hematoencefálica (Jiang *et al.*, 2012).

5 Y en el documento de patente CN108126209, se describe un nanosistema de liberación de curcumina; este nanosistema es un conjugado polímero-fármaco, en el cual, el polietilenglicol (PEG) se hace reaccionar con un fármaco quimioterapéutico dirigido específicamente a un sitio blanco en las células tumorales, y posteriormente se realiza la reacción que permite el encapsulamiento de curcumina en el nanosistema.

10 Sin embargo, la principal desventaja en el uso de este tipo de polímeros, es que se requieren solventes altamente tóxicos como diclorometano y N,N-dimetilformamida (DMF) para su solubilización en el proceso de formación de las nanopartículas (Jiang *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015).

Por otra parte, Lim *et al.*, 2011 demostraron que las nanopartículas de CUR realizadas con polímeros sintéticos pueden ralentizar el crecimiento de GBM a través de la
15 inhibición de la proliferación celular. Sin embargo, la utilización de polímeros sintéticos como poli(N-isopropilacrilamida) (poli-(NIPAAm)) y sus derivados, para la elaboración de tales nanopartículas se ve limitada debido a que no son biodegradables; y la presencia de los polímeros no degradables en el cuerpo humano podría causar una
20 respuesta inflamatoria crónica y dificultar las dosis múltiples (Cui *et al.*, 2012).

Recientemente, los nanosistemas de quitosano, un aminopolisacárido biocompatible, biodegradable y no tóxico, han sido objeto de numerosas investigaciones y patentes, con el fin de mejorar la eficiencia de entrega controlada y la biodisponibilidad de diferentes moléculas activas a sitios de interés. Por ejemplo, las nanocápsulas
25 coloidales, que comprenden un centro oleoso, lecitina y una capa de polímero, es un sistemas de gran interés debido a su potencial prometedor como plataforma efectiva de administración de fármacos para la administración de péptidos, fármacos lipófilos y vacunas (Goycoolea *et al.*, 2012).

Ejemplos de lo anterior se tienen en el documento de patente KR20150134443, en
30 donde se describe la preparación de nanopartículas de ácido palmítico, colesterol y

TPGS (d- α -Tocoferill polietilen glicol 1000 succinato), cargadas de curcumina y cubiertas con una capa de N-trimetilquitosano; se refiere así también la aplicación de las nanopartículas en el tratamiento de padecimientos del sistema nervioso central como Alzheimer y gliomas. Y en el documento de patente US2018280517 A1 se describe la preparación por métodos de entrecruzamiento de nanocompuestos que comprenden un quitosano anfifílico y un componente anticancerígeno como curcumina o gemcitabina, entre otros, y se describe también su aplicación en terapias contra cáncer.

El quitosano es una entidad química que puede ser funcionalizada de acuerdo con las propiedades finales deseadas o a la especificidad de las moléculas con las cuales se desea acoplar (Goycoolea *et al.*, 2012; Luque-Alcaraz *et al.*, 2012; Higuera-Ciapara *et al.*, 2004). De modo que, modificaciones estructurales del quitosano pueden mejorar su solubilidad a pH neutro y alcalino sin necesidad de afectar otras características importantes (Anitha *et al.*, 2011). Últimamente, el carboximetilquitosano (CMC) y el lactato de quitosano (LTC) están siendo utilizados para la nanoencapsulación de fármacos como doxorubicina, ciprofloxacina, enalaprilato, entre otros.

Breve descripción de las figuras

En la **Figura 1** se muestra una representación de imágenes de las nanocápsulas (NC) observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). NC-CMC (nanocápsulas de carboximetil quitosano), NC-CMC-CP (nanocápsulas de carboximetil quitosano con capsaicina), NC-CMC-CUR (nanocápsulas de carboximetil quitosano con curcumina), NC-LTC (nanocápsulas de lactato de quitosano), NC-LTC-CP (nanocápsulas de lactato de quitosano con capsaicina), NC-LTC-CUR (nanocápsulas de lactato de quitosano con curcumina).

En la **Figura 2** se muestra un gráfico en el que se ilustran los resultados de la determinación *in vitro* de la viabilidad de células de glioblastoma sometidas a los diferentes tratamientos con las nanocápsulas de la invención. En el panel A, se muestran los resultados de las pruebas realizadas sobre la línea celular CRL-1620 (A-172); el panel B ilustra los resultados de las pruebas realizadas sobre la línea celular

U87 MG (HTB-14). La determinación se realizó mediante un ensayo de MTT. Control de crecimiento celular: Control 100%; Control solvente: Etanol; Soluciones acuosas de polímeros: Carboximetilquitosano (CMC) y lactato de quitosano (LCT). Capsaicina (CP) a 300 μ M y Curcumina (CUR) a 30 μ M. Nanocápsulas con o sin compuesto activo: NC
5 CMC, NC CMC CP, NC CMC CUR, NC LTC, NC LTC CP, NC LTC CUR.

Descripción de la invención

La invención se refiere a un nanosistema de liberación, conformado por nanocápsulas (NC) que comprenden de un polímero de quitosano modificado seleccionado de
10 carboximetil quitosano y lactato de quitosano y una molécula biológicamente activa, de naturaleza lipófila, con actividad de inhibición de células de tumores del sistema nervioso central (SNC) como los gliomas. La producción de las nanocápsulas de la invención que incorporan compuestos hidrofóbicos activos contra cáncer, particularmente del tipo de tumores del SNC, se basó en el procedimiento descrito en
15 Goycoolea *et al.*, 2012 de desplazamiento de solvente por evaporación; no obstante, se llevaron a cabo las modificaciones necesarias para dar lugar a las nanocápsulas de la invención. De manera general, la producción de las nanocápsulas implica la preparación de una fase orgánica compuesta por un aceite y un surfactante, además del compuesto con actividad biológica, los cuales están disueltos en un solvente
20 orgánico, y la posterior adición de una fase acuosa en donde se encuentra el polímero de quitosano modificado. Los solventes orgánicos son evaporados para la formación de las estructuras de nanocápsula coloidal de núcleo cubierta que tienen incorporados los compuestos hidrofóbicos de interés.

La capa polimérica en las nanocápsulas les confiere mayor estabilidad y protección a
25 la agregación, permite un cambio en el perfil de liberación del compuesto activo asociado; pudiendo facilitarse además una mayor internalización celular y una interacción específica con determinados tipos de células. Comparado con otros nanosistemas, en los que generalmente se ven condicionados a una limitada carga del fármaco, las nanocápsulas de la invención poseen una mayor posibilidad de carga,

particularmente de sustancias lipofílicas/hidrofóbicas debido a la formación del núcleo oleoso por la mezcla aceite-surfactante.

De conformidad con la invención, los compuestos hidrofóbicos con actividad contra tumores del SNC que se incorporan en las nanocápsulas son compuestos
5 capsaicinoides incluyendo capsaicina, dihidrocapsaicina, vanillilamina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homocapsaicina, nonivamida, ω -hidroxicapsaicina, capsiato, capsazepina, derivados de capsaicina y sus mezclas; u opcionalmente son compuestos curcuminoideos incluyendo curcumina, desmetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, derivados de curcumina y sus mezclas.

10 En un primer aspecto de la invención, el surfactante utilizado para producir la nanoemulsión se selecciona del grupo que comprende preferentemente fosfolípidos incluyendo lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Además, es posible también la utilización de un surfactante seleccionado del grupo de:
15 colesterol, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (polisorbatos) y ésteres de ácidos grasos de sorbitán (como Span® y Arlacel®).

En una modalidad preferida del primer aspecto de la invención, el surfactante es lecitina, la cual se puede seleccionar de entre lecitina de soya, lecitina de yema de
20 huevo, o lecitina de girasol.

En otro aspecto de la invención, el aceite presente en la fase orgánica, y que permite la formación del núcleo oleoso de las nanocápsulas, puede ser opcionalmente aceite natural, semisintético o sintético; por ejemplo, entre ellos se pueden seleccionar Miglyol® (triglicérido caprílico/cáprico); Labrafil® (Mono-, di- y triglicéridos y PEG-6 (MW
25 300) mono- y diésteres de ácido oléico (C18:1); Labrafac® (Triglicéridos caprílico/cáprico C8:C10); Peceol® (Mono-, di- y triglicéridos de ácido oléico); y Maisine® (Mono-, di-, y triglicéridos de principalmente ácidos linoléico (C18:2) y oléico (C18:1); derivados de estos o combinaciones de estos. De forma preferencial es el Miglyol® (810 – C8:C10 (70:30%); 812 – C8:C10 (55:41%); y 829 –
30 caprílico/cáprico/succínico).

Un aspecto más de la invención se relaciona a la selección del solvente orgánico para la solubilización del compuesto activo, el cual puede ser opcionalmente etanol, metanol, DMSO, cloroformo y diclorometano.

5 Una modalidad más de la invención se refiere a la utilización del nanosistema de liberación de compuestos hidrofóbicos con actividad de inhibición de la proliferación de células de tumores del sistema nervioso central (SNC) para la elaboración de composiciones de utilidad en el tratamiento de tumores del sistema nervioso central (SNC), preferiblemente los gliomas y más preferiblemente los glioblastomas.

10 Las nanocápsulas de la invención poseen características fisicoquímicas adecuadas para ser eficientes sistemas para el transporte de moléculas activas, específicamente, de moléculas de naturaleza hidrofóbica, como son los capsaicinoides y curcuminoides.

Con la finalidad de proporcionar elementos que permitan una mejor comprensión de la presente invención se muestran a continuación ejemplos de realización y de aplicación de la invención, sin que deban ser por ello considerados como limitantes para la misma:

15 **Ejemplo 1. Preparación de las nanocápsulas**

Se utilizó carboximetil quitosano (Heppe Medical Chitosan GmbH), o lactato de quitosano (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO); Mygliol 812® fue obtenido de Sasol. Lecitina (Epikuron 145 V, Cargill) Capsaicina, curcumina, etanol reactivo fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Acetona grado reactivo de J.T. Baker.

20 Se preparó una solución homogénea de lecitina (40 mg) y Miglyol 812® (125 µL), y etanol (0.5 mL). Después, en un vaso de precipitado se colocaron 9.5 mL de acetona y directamente a la acetona se vertió rápidamente la solución de lecitina:Miglyol. El compuesto activo se disolvió previamente en etanol para añadirse a la solución lecitina:Miglyol.

25 Posteriormente, la fase orgánica compuesta por lecitina:Miglyol, compuesto activo y acetona fue vertida a una solución acuosa que contenía el polímero disuelto.

Se produjeron nanocápsulas formadas con el polímero carboximetil quitosano (CMC), y nanocápsulas formadas con el polímero lactato de quitosano (LTC). En todos los casos, se mantuvieron proporciones de entre 0.5 – 2:0.1 – 0.75 (lecitina:CMC/LTC). En

tanto que el Mygliol se utilizó en concentraciones de entre 75 a 150 μL , preferentemente de 125 μL .

Además, se prepararon nanocápsulas conteniendo como compuesto activo capsaicina (NC CMC/LTC CP), en concentraciones de entre 2.5 mM y 20 mM, preferentemente 10mM. Y, se prepararon también nanocápsulas conteniendo curcumina (NC CMC/LTC CUR) en concentraciones de entre 0.25 mM y 2 mM, preferentemente 1 mM. Estando en todos los casos, disuelto el compuesto activo en etanol. Y, se prepararon también nanocápsulas sin compuesto activo (NC CMC y NC LTC).

Ejemplo 2. Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas.

10 Las nanocápsulas se aislaron por técnica de centrifugación a 20,000 rpm durante 1 hr a 7°C, después se tomó el sobrenadante y se realizó un segundo ciclo de centrifugación a 20,000 rpm durante 40 min a 7°C. La eficiencia de encapsulación o cuantificación de polímero encapsulado se determinó tomando el sub-nadante y midiendo la longitud de onda con un espectrofotómetro de UV/Vis. La distribución del tamaño de partícula de las nanocápsulas se determinó utilizando dispersión de luz dinámica, mientras que la carga superficial de las nanocápsulas fue determina con el potencial Z. Ambos parámetros fueron obtenidos utilizando el instrumento Nano ZS90 de la marca Malvern. La morfología de las nanocápsulas se observó por microscopía de transmisión (TEM) mediante tinción negativa en un equipo TEM 200CX. En la Figura 1 se presentan imágenes representativas de las nanocápsulas, se observó de manera general una morfología esférica con tamaños dentro de los rangos señalados en el cuadro 1. Las imágenes TEM de las nanocápsulas revelaron una estructura núcleo-cubierta que incluye una superficie delgada con topografía irregular.

El cuadro 1 incluye a manera de ejemplo no limitativo, resultados obtenidos de la caracterización de las nanocápsulas. El tamaño de partícula de las nanocápsulas se encuentra en un rango aproximado de 160 a 400 nm de diámetro (índice de polidispersidad PDL $\sim 0.1 - 0.25$). Por otro lado, el potencial Z para las NC de CMC se encuentran en un rango de - 50 a -70 mV, y para las NC de LTC los rangos están entre +30 a +50 mV. De acuerdo con estos valores, estos sistemas son considerados estables, ya que valores mayores a (+/-) 30 mV indican la presencia de repulsión

eléctrica entre las nanocápsulas y, en consecuencia, se evita la agregación de las partículas.

Se determinó además la eficiencia de encapsulación de la capsaicina y la curcumina, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis y se midió a una longitud de onda de 280 nm y 425 nm, respectivamente. Para determinar el porcentaje de encapsulación se utilizó la siguiente fórmula:

$$EE\% = \frac{\text{Concentración de compuesto activo}_{total} - \text{Concentración de compuesto activo}_{libre}}{\text{Concentración de compuesto activo}_{total}} \times 100$$

10

Las NC unidas a capsaicina (CP) mostraron un porcentaje de encapsulación de 90 a 95 %. Mientras que el porcentaje de encapsulación de las NC unidas a curcumina (CUR) fue de 80 a 90 %. Este resultado indica que los sistemas son eficientes para la encapsulación de compuestos con características hidrofóbicas.

15

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas.

Muestra	Promedio (d.nm)	Pdl	Potencial Z	% EE
NC CMC	202 ± 9	0.13 ± 0.04	- 62 ± 4	-
NC CMC CP	179 ± 10	0.10 ± 0.01	- 56 ± 4	91 ± 1
NC CMC CUR	190 ± 29	0.17 ± 0.08	- 66 ± 10	89 ± 2
NC LTC	292 ± 32	0.24 ± 0.03	+ 44 ± 2	-
NC LTC CP	335 ± 33	0.25 ± 0.01	+ 48 ± 1	90 ± 5
NC LTC CUR	309 ± 23	0.20 ± 0.07	+ 40 ± 2	81 ± 4

20

25

Ejemplo 3. Evaluación de la actividad antiproliferativa en líneas de células de glioblastoma, próstata y normales.

La potencial aplicación de las nanocápsulas de la invención, se probó en ensayos *in vitro*, en los que se evaluó su capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales. Para este fin, se determinó la viabilidad de células de glioblastoma sometidas a diferentes tratamientos en los que se utilizaron las nanocápsulas de la invención. Se utilizaron las líneas celulares de glioblastoma CRL-1620 (A-172), U118MG (HTB15), U87MG (HTB-14) y H4 (HTB-148) utilizando el método del MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Las células fueron mantenidas en medio de DMEM ó EMEM con suero de bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina-estreptomicina al 0.5%. Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Para el ensayo de MTT, las células (100 µL) fueron colocadas en una placa de cultivo celular de 96 pozos (5,000 células por pozo para CRL-1620, U118MG y U87 MG y 2,500 células por pozo para H4) y se dejaron para su adhesión durante 24 h. Después de este tiempo, los tratamientos (100 µL) fueron colocados y se incubó durante 3 días. Posteriormente se colocó el MTT (20 µL) a una concentración de 5 mg/mL y se incubó durante 4 h. Se retiraron 100 µL de medio y los cristales de formazan se solubilizaron con alcohol isopropílico acidificado y finalmente se midió la absorbancia a 570 nm y restando la absorbancia de fondo a 690 nm. En la Figura 2 se observan los resultados correspondientes a las células CRL-1620 y U87 MG. En ambos casos el control solvente y las soluciones acuosas de CMC y LTC no presentaron actividad inhibitoria en comparación con el control de viabilidad. En el gráfico se adicionaron los controles de CP y CUR libre para observar el efecto sobre las células con mayor claridad. Todas las nanocápsulas se probaron a la misma concentración de CP 300 µM, o CUR 30 µM, y los tratamientos con las nanocápsulas con y sin compuesto activo se aplicaron a las mismas concentraciones de portadores. Como se observa en la figura 2, las nanocápsulas con CP y CUR redujeron significativamente la viabilidad celular en comparación con sus homólogos sin compuesto activo a las mismas concentraciones de portadores. También se observó que no hubo efecto debido a las nanocápsulas de CMC o LTC sin compuesto activo sobre las líneas celulares.

REIVINDICACIONES

1. Un nanosistema de liberación de compuestos hidrofóbicos compuesto por nanocápsulas de estructura coloidal de núcleo oleoso, caracterizado porque dichas nanocápsulas están formadas por carboximetil quitosano; un aceite seleccionado de los aceites disponibles comercialmente bajo las denominaciones Miglyol® (Triglicérido caprílico/cáprico), Labrafil® (Mono-, di- y triglicéridos y PEG-6 (MW 300) mono- y diésteres de ácido oleico (C18:1)), Labrafac® (Triglicéridos caprílico/cáprico C8:C10), Peceol® (Mono-, di- y triglicéridos de ácido oleico) o Maisine® (mono- di- y triglicéridos de principalmente ácidos linoleico (C18:2) y oleico (C18:1)); un surfactante seleccionado del grupo que comprende lecitina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, colesterol, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (polisorbatos) y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; e incorporado en el núcleo oleoso, un compuesto hidrofóbico con actividad de inhibición de la proliferación de células de tumores del sistema nervioso central (SNC) seleccionado de compuestos capscapsaicinoides o de compuestos curcuminoideos; en donde dichas nanopartículas poseen carga superficial negativa determinada por el potencial Z.
2. El nanosistema de liberación de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aceite preferiblemente es Miglyol® 810 (Triglicérido caprílico/cáprico C8:C10 (70:30%)), 812 (Triglicérido caprílico/cáprico C8:C10 (55:41%)) o 829 (Triglicérido caprílico/cáprico/succínico).
3. El nanosistema de liberación de conformidad con la reivindicación 1, en donde la lecitina se selecciona de entre lecitina de soya, lecitina de yema de huevo, o lecitina de girasol.
4. El nanosistema de liberación de conformidad con la reivindicación 1, en donde los compuestos capsaicinoides incluyen capsaicina, dihidrocapsaicina,

vanillilamina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homocapsaicina, nonivamida, ω -hidroxycapsaicina, capsiato, capsazepina, derivados de capsaicina y sus mezclas.

- 5
5. El nanosistema de liberación de conformidad con la reivindicación 1, en donde los compuestos curcuminoides incluyen curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, derivados de curcumina y sus mezclas.
- 10
6. Uso del nanosistema de liberación de compuestos hidrofóbicos con actividad de inhibición de la proliferación de células de tumores del sistema nervioso central (SNC) como el que se describe en las reivindicaciones 1 – 5, para la elaboración de composiciones de utilidad en el tratamiento de tumores del sistema nervioso central (SNC).
- 15
7. Uso de conformidad con la reivindicación 6, en donde los tumores del sistema nervioso central comprenden los gliomas, preferiblemente, los glioblastomas.
- 20
- 25

RESUMEN

La presente invención se relaciona a la nanomedicina, particularmente se refiere a un sistema que comprende nanocápsulas conformadas por un polímero de quitosano modificado del tipo de carboximetil quitosano o lactato de quitosano, y una molécula de naturaleza lipófila, con actividad de inhibición de la proliferación de las células de tumores del sistema nervioso central (SNC) como los gliomas y glioblastomas. La invención se refiere también a la utilización de los nanosistemas de liberación de las moléculas con actividad antiproliferativa para la preparación de composiciones útiles en las terapias de tratamiento contra los tumores del sistema nervioso central (SNC).

15

1/2

Figura 1

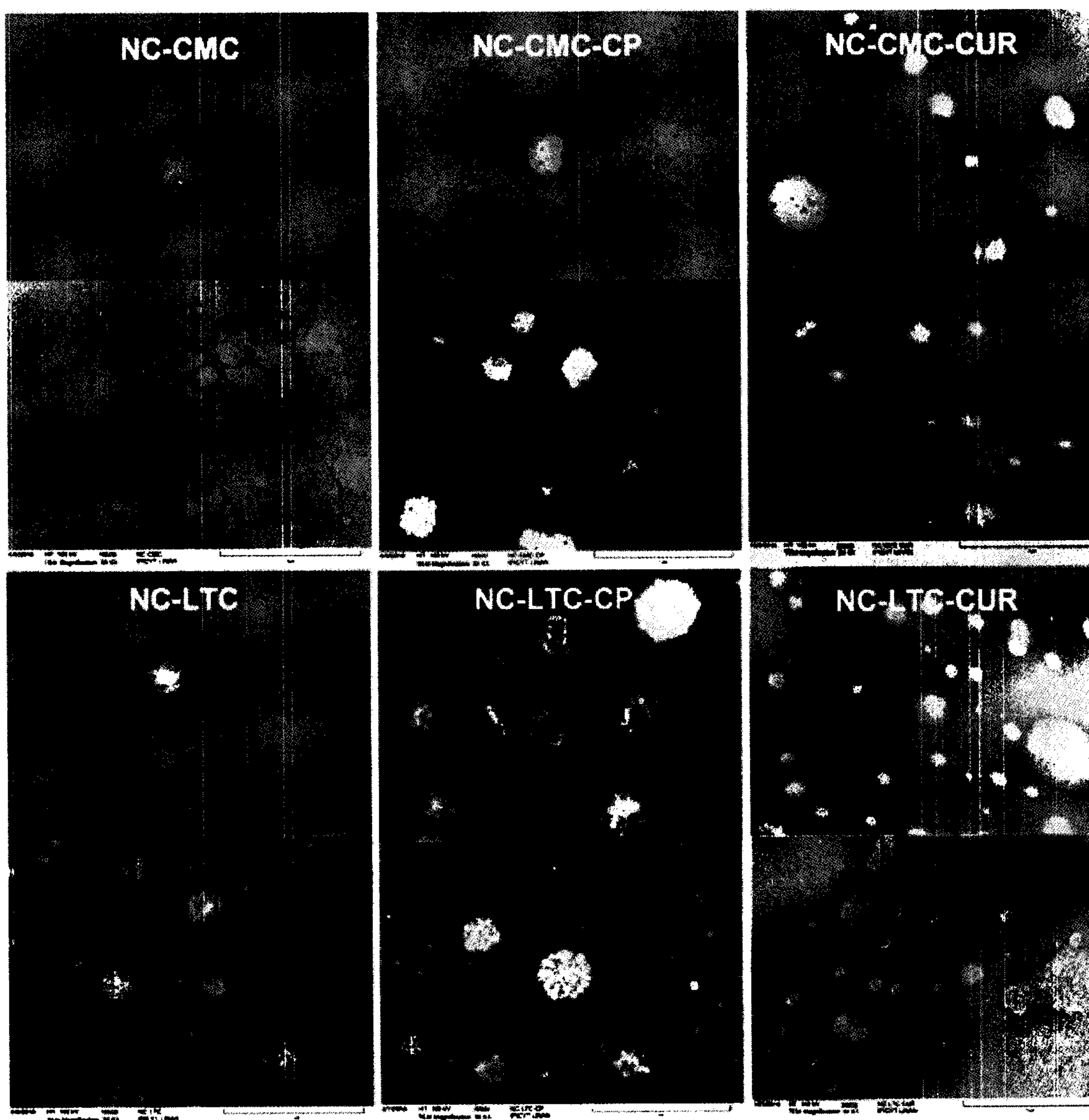


Figura 2

