

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 521**

21 Número de solicitud: 201330233

51 Int. Cl.:

**A61K 31/16** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**20.02.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.09.2014**

Fecha de la concesión:

**11.08.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**18.08.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070129**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA  
INVESTIGACIÓN DE MÁLAGA EN BIOMEDICINA  
Y SALUD (FIMABIS) (50.0%)**

**Avda. Carlos Haya, 82, Pabellón A, 7ª planta  
29010 Málaga (Málaga) ES y  
UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ DE FONSECA, Fernando;  
PAVÓN MORÓN, Francisco Javier;  
SERRANO CRIADO, Antonia ;  
ROMERO CUEVAS, Miguel ;  
WULFF PÉREZ, Miguel;  
GÁLVEZ RUIZ, María José;  
MARTÍN RODRÍGUEZ, Antonio y  
DE VICENTE ÁLVAREZ-MANZANEDA, Juan**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Formulaciones basadas en nanoemulsiones y su uso para el tratamiento de la obesidad**

57 Resumen:

Formulaciones basadas en nanoemulsiones y su uso para el tratamiento de la obesidad.

La presente invención es de interés para el sector farmacéutico. Se refiere a nuevas formulaciones terapéuticas basadas en nanoemulsiones de aceites vegetales como sistema transportador de fármacos derivados de N-aciletanolaminas (NAEs) para su administración como herramienta farmacológica y como fármacos para la inducción de saciedad y control de la ingesta, modulación de los efectos metabólicos proanorexígenos y prevención de ganancia de peso.

ES 2 498 521 B1

## DESCRIPCIÓN

### Formulaciones basadas en nanoemulsiones y su uso para el tratamiento de la obesidad

La presente invención es de interés para el sector farmacéutico. Se refiere a nuevas formulaciones terapéuticas basadas en nanoemulsiones de aceites vegetales como sistema transportador de fármacos derivados de N-aciletanolaminas (NAEs) para su administración como herramienta farmacológica y como fármacos para la inducción de saciedad y control de la ingesta, modulación de los efectos metabólicos proanorexígenos y prevención de ganancia de peso.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La obesidad es una enfermedad cuya incidencia ha crecido espectacularmente en los últimos 20 años hasta alcanzar el rango de epidemia global del siglo XXI en prácticamente todos los países según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Dicho organismo estableció en 2011 el sobrepeso y la obesidad como el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo, con una tasa de 2,8 millones de personas adultas muertas (OMS, 10 datos sobre la obesidad 2010) y una previsión de 2.300 millones de adultos con sobrepeso y unos 700 millones con obesidad para el año 2015. La repercusión en la salud pública es enorme, ya que la obesidad está relacionada con enfermedades cardiovasculares, metabólicas (diabetes, colesterolemia, trigliceridemia,..) dermatológicas, gastrointestinales, osteoarticulares y/o algunos cánceres como el cáncer de colon. Según datos de la OMS, el 44% de la carga de diabetes tipo 2 es atribuible a la obesidad o sobrepeso (OMS. Nota descriptiva N°311, 2011).

Una de las estrategias utilizadas para intentar solucionar este problema es el uso de herramientas farmacológicas con distintos mecanismos de acción y dirigidas a distintas dianas biológicas. Sin embargo, esta línea de tratamiento no acaba de consolidarse debido a los problemas de efectos adversos, que han provocado la retirada del mercado de muchos de los fármacos comercializados por las principales agencias de seguridad del medicamento (USFDA de Estados Unidos y EMA de Europa), destacando los casos de:

a) *Rimonabant* (SR141716A, Acomplia y Zimulti de Sanofi-Aventis) es el primer antagonista/agonista inverso de los receptores cannabinoides tipo 1 CB1 (relacionado con las NAEs) aprobado en 2006 para el tratamiento de pacientes obesos o pacientes con sobrepeso con factores de riesgo asociados, tales como diabetes tipo 2 o dislipidemia. Sin embargo, a partir de estudios clínicos se observaron efectos adversos psiquiátricos que

incluían trastornos depresivos y ansiedad, así como mayor riesgo de suicidio. Por ello se retiró del mercado en 2007 (EE.UU.) y 2008 (Europa).

- 5 b) Un inhibidor central de recaptación de serotonina y norepinefrina llamado *sibutramina* (Meridia o Reductil de Abbott Laboratorios) no exento de efectos cardiovasculares. De hecho se mostró que causa infartos de miocardio e ictus en pacientes con sobrepeso con enfermedad cardíaca preexistente. Por ello se retiró en 2010.

Así, el arsenal farmacológico actual contra la obesidad sigue siendo reducido:

- 10 a) Un inhibidor de lipasa llamado *orlistat* (Xenical de Roche) con efectos secundarios gastrointestinales: flatulencias, diarrea, dolor abdominal, dispepsias e incluso deficiencia en vitaminas liposolubles a largo plazo.
- b) Una anfetamina llamada *phentermine* (Adipex-P de Teva Pharmaceuticals y Ionamin de Medeva Pharmaceuticals) que puede aumentar la presión arterial (puede inducir hipertensión pulmonar primaria y problemas cardíacos) y provocar insomnio.
- 15 Recientemente ha sido aprobado por la USFDA un nuevo medicamento antiobesidad surgido de la combinación de phentermine y un antiepiléptico: *topiramate* (Qsymia de Vivus Inc.).

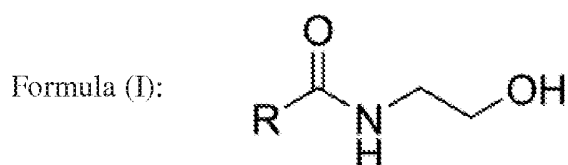
20 Por tanto, la necesidad de encontrar terapias farmacológicas eficaces y seguras a largo plazo frente a la obesidad sigue siendo uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica y la investigación a nivel mundial.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

25 La presente invención se refiere al diseño y desarrollo de nanoemulsiones (o/w) útiles para la vehiculización de N-aciletanolaminas, caracterizadas por comprender (a) una fase acuosa (b) una fase oleosa, que comprende un aceite, constituida por gotas de diámetro medio inferior a 500 nanómetros; c) un copolímero en bloques anfifílico y d) una N-aciletanolamina.

30 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una nanoemulsión (de aquí en adelante “nanoemulsión de la invención”) del tipo aceite en agua (o/w) adecuada para la administración de N-aciletanolaminas, que comprende:

- a. Una fase acuosa;
- b. Una fase oleosa que comprende un aceite constituida por gotas de diámetro inferior a 500 nanómetros;
- c. Un copolímero en bloques anfifílico; y
- d. Un compuesto de formula (I):



donde el grupo R es un alquilo lineal (C11-C21) o un alquenilo lineal (C11-C21) con 1-6 dobles enlaces y donde el ratio peso/peso (p/p) copolímero/fase oleosa se encuentra entre 0,02 y 0,24. Preferiblemente, dicho ratio (p/p) copolímero/fase oleosa se encuentra entre 0,02 y 0,16, más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolímero/fase oleosa se encuentra entre 0,032 y 0,08 y aún más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolímero/fase oleosa es 0,04.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la fase acuosa se encuentra a una concentración entre un 5% y un 45% en peso por volumen total de la nanoemulsión (p/v).

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el copolímero en bloques anfifílico es un poloxámero. En una realización aún más preferida el copolímero en bloques anfifílico se selecciona de la lista que consiste en plurónico F68 y plurónico F127.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la fase oleosa se selecciona de la lista que consiste en aceite de girasol, cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma,  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente la fase oleosa consiste en aceite de girasol.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el compuesto de formula (I) es N-oleiletanolamina.

Un segundo aspecto de la invención, se refiere a un procedimiento para la obtención de la nanoemulsión de la invención, que comprende: i) disolver el/los copolímeros en agua bajo agitación suave; ii) añadir el aceite gota a gota a la fase acuosa producida en la etapa i), bajo agitación mecánica, produciendo una pre-emulsión; iii) reducir el tamaño de las gotas de la emulsión haciendo pasar en repetidas ocasiones la pre-emulsión de la etapa ii) por un homogeneizador de alta presión, formandose así la nanoemulsión; iv) añadir bajo agitación suave a la nanoemulsión de la etapa iii) un compuesto de la fórmula (I)

10 Un tercer aspecto de la invención se refiere a la nanoemulsión de la invención para su uso en terapia.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de la nanoemulsión de la invención para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad. Alternativamente, este cuarto aspecto de la invención se refiere a la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad. Preferiblemente, la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad se administra oralmente.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de la nanoemulsión de la invención para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia. Alternativamente, este quinto aspecto de la invención se refiere a la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia. Preferiblemente, la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia se administra oralmente.

25 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, dicha dislipemia se selecciona de la lista que consiste en hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia de tipo I, IIa, IIb, III, IV ó V, hiperquilimicronemia o hiperlipidemia combinada.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la nanoemulsión de la invención y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Estructura química de Plurónico F68 y F127 (A), y OEA (B).

**Figura 2.** Propiedades de las nanoemulsiones. (A) Tamaño y estabilidad en el tiempo de las nanoemulsiones, medido mediante Dynamic Light Scattering. (B) Biodegradación controlada de las nanoemulsiones bajo condiciones duodenales simuladas *in vitro*. Para la realización de este ejemplo se han utilizado las nanoemulsiones detalladas en los ejemplos 1 y 2.

**Figura 3.** Evolución de peso relativo en ratas Wistar macho (N=8 por grupo) tras la administración diaria (i.p.) de salino, Tween 20 (10% en salino), nanoemulsión G-F68 (10% en salino) ó G-F127 (10% en salino) durante 3 semanas. Columnas representan medias  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados por ANOVA (2 vías: tiempo y tratamiento) y post-tests Bonferroni. \*P<0,05 y \*\*P<0,01 respecto al grupo control salino.

**Figura 4.** Consumo de comida de ratas Wistar macho (N=8 por grupo) en ayunas tras la administración aguda de salino o nanoemulsión. (A) Tiempo: 30, 60, 120 y 240 minutos. (B) Tiempo: 24 horas. Columnas representan medias  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados por ANOVA (2 vías: tiempo y tratamiento) y post-tests Bonferroni.

**Figura 5.** Consumo de comida de ratas Wistar macho (N=8 por grupo) en ayunas tras la administración aguda de OEA vía i.p. en nanoemulsión. (A) Tiempo: 30, 60, 120 y 240 minutos. (B) Tiempo: 24 horas. Columnas representan medias  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados por ANOVA (2 vías: tiempo y tratamiento) y post-tests Bonferroni. \*P<0,05 y \*\*\*P<0,001 respecto al grupo control nanoemulsión.

**Figura 6.** Consumo de comida de ratas Wistar macho (N=8 por grupo) en ayunas tras la administración aguda de OEA vía oral en nanoemulsión. (A) Tiempo: 30, 60, 120 y 240 minutos. (B) Tiempo: 24 horas. Columnas representan medias  $\pm$  SEM. Los datos fueron analizados por ANOVA (2 vías: tiempo y tratamiento) y post-tests Bonferroni. \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 respecto al grupo control nanoemulsión.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se enfrenta al problema de encontrar terapias farmacológicas eficaces y seguras a largo plazo frente a la obesidad. La presente invención resuelve este problema a través del diseño y desarrollo de nanoemulsiones aceite en agua (o/w) útiles para la vehiculización de N-aciletanolaminas, caracterizadas por comprender (a) una fase acuosa (b) una fase oleosa, que comprende un aceite, constituida por gotas de diámetro medio inferior a 500 nanómetros; c) un copolímero en bloques anfifílico y d) una N-aciletanolamina.

10 Resulta conocido que una de las dianas farmacológicas validada para el tratamiento de la obesidad es el sistema de señalización de las N-aciletanolaminas (NAEs), que está relacionado con el balance energético, el control del apetito y la adiposidad. El mismo comprende las NAEs (N-araquidoniletanolamina, N-palmitiletanolamina, N-oleiletanolamina, etc.) además de aquellas proteínas y moléculas involucradas en su síntesis, actividad (receptores cannabinoides CB1 y CB2; canal iónico vanilloide TRPV1; y el factor de transcripción PPAR alfa) y degradación. En especial, la NAE N-oleiletanolamina (OEA) ha sido descrita como un potente mediador anorexígeno a nivel periférico (principalmente en tejido adiposo y tracto gastrointestinal), a partir del cual se han descrito distintos derivados sintéticos capaces de inducir saciedad, modular la grasa corporal y prevenir la excesiva ganancia de peso. Pero, aunque sus características de ácidos grasos hacen de ellas moléculas con bajos perfiles toxicológicos, su naturaleza liposoluble es un problema para su adecuada administración, lo que supone un verdadero obstáculo para su uso como medicamentos.

Hasta el momento, para la administración de este tipo de compuestos liposolubles cannabinoides, vanilloides o NAEs en ensayos in vivo, se han utilizado diversos tipos de sustancias como vehículo. Sin embargo, aunque puedan dar resultados relativamente efectivos en ensayos experimentales bajo paradigmas crónicos/subcrónicos de administración en modelos animales de investigación, todavía presentan problemas a la hora de su desarrollo como medicamentos tales como los que se mencionan a continuación:

30

- a) Disolventes orgánicos como propilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, metanol (normalmente en suero fisiológico en porcentaje que oscila 30-95%). Su principal inconveniente es el grado toxicidad no admitido para su uso como medicamento.
- 5 b) Surfactantes como Tween 20 y 80 [Polioxietilen (20/80) sorbitan monolaurato]. Si bien estos compuestos mejoran el problema de la toxicidad general de los disolventes orgánicos, se ha descrito problemas de hepatotoxicidad y la afectación parámetros clave para evaluar moléculas anti-obesidad (irritación, afectación del sistema inmunológico, reducción en la ganancia de peso, menor consumo de comida, hemólisis, niveles circulantes de adiposidad alterados, aumento del contenido graso en hígado...).
- 10 c) Polímeros orgánicos como la carboximetilcelulosa se ha utilizado para su administración por vía oral. Sin embargo, los fármacos muestran actividad antiobesidad solo a altas dosis, lo que podría acarrear problemas de toxicidad y sobredosificación.
- d) Emulsiones comerciales, por ejemplo Tocrisolve® 100 (Tocris Bioscience) a partir de aceite de soja, agua y plurónico F68 presentan un perfil no tóxico de acuerdo con sus datos de seguridad. Pero, si bien la administración sistémica intraperitoneal, intramuscular
- 15 o subcutánea permite el uso de este tipo de emulsiones, la administración oral es complicada debido a las condiciones opuestas a la absorción en el tracto gastrointestinal de los fármacos contenidos (pH, agentes complejantes, bilis, presencia de alimentos, motilidad, enzimas como las lipasas...), afectando la absorción y biodisponibilidad del fármaco.
- 20

Sin embargo, los autores de la presente invención han descubierto como sorprendentemente nanoemulsiones concretas caracterizadas por comprender (a) una fase acuosa (b) una fase oleosa, que comprende un aceite, constituida por gotas de diámetro medio inferior a 500 nanómetros y c)

25 un copolímero en bloques anfifílico, resultan especialmente útiles para la vehiculación farmacológica de N-aciletanolaminas y no presentan ninguno de los problemas mencionados anteriormente. De este modo, los autores de la presente invención han evaluado este tipo de nanoemulsiones in vivo en ratas Wistar macho durante 3 semanas frente a otros vehículos habitualmente empleados para fármacos liposolubles, tales como Tween 20 (10% en salino v/v).

30 Utilizando suero fisiológico como grupo control de referencia, los animales tratados con las nanoemulsiones de la presente invención mostraron un perfil toxicológico significativamente



mejorado respecto a aquellos tratados con Tween 20 y similar a los tratados únicamente con suero (ver ejemplo 4).

Es importante resaltar que las nanoemulsiones de la invención se han sintetizado a partir de la  
5 identificación de los mecanismos de estabilidad/inestabilidad de las nanoemulsiones de aceites en  
agua. La información estructural obtenida por reología se ha relacionado con el comportamiento  
macroscópico de las nanoemulsiones, relacionando de esta forma estructura con funcionalidad.  
Paralelamente a estos trabajos se ha llevado a cabo un estudio comparativo de reacciones de  
10 hidrólisis de aceites mediante lipasas, a través de la simulación de procesos de degradación en el  
intestino, haciendo uso de un tensiómetro de gota pendiente. En este sentido, para el desarrollo y  
selección de estas nanoemulsiones se ha investigado el efecto de la presencia de sales biliares,  
componentes fundamentales en los procesos de lipólisis. Se ha analizado cómo afectan las  
condiciones gástricas, duodenales e intravenosas a las nanoemulsiones, y especialmente la acción  
15 de las respectivas lipasas (lipólisis), ya que esta acción está directamente relacionada con la  
velocidad y lugar de liberación del fármaco dentro del organismo así como su posterior  
absorción. De esta forma se realizó la experimentación mostrada en la figura 2 utilizando una  
serie de nanoemulsiones de acuerdo con las especificaciones dadas en los ejemplos 1 y 2 de la  
memoria, es decir se utilizó una nanoemulsión donde el ratio surfactante/aceite (p/p) se encuentra  
20 entre 0,032 y 0,08. De esta forma la proporción surfactante/aceite era suficiente para recubrir  
correctamente las gotas y que éstas tuvieran un tamaño inferior a 500 nm (es decir, una  
concentración de surfactante superior a 0,5% en peso/volumen), pero no excesiva a fin de no  
desestabilizar la nanoemulsión por depleción-floculación (es decir, inferior al 6% en  
peso/volumen), produciendo por tanto condiciones óptimas de tamaño, recubrimiento de las gotas  
y estabilidad. Estos ensayos de lipólisis duodenal simulada fueron realizados mezclando las  
25 nanoemulsiones descritas anteriormente con un buffer de digestión duodenal que contiene los  
principales componentes implicados en la digestión (sales biliares, lipasa pancreática, cloruros de  
sodio y calcio, etc.) con concentraciones similares a las del organismo, y midiendo la  
disminución de la intensidad de luz retrodispersada, directamente relacionada con el tamaño de  
las gotas de nanoemulsión. Así, al producirse la lipólisis, los triglicéridos que componen las gotas  
30 de nanoemulsión son convertidos en productos que abandonan dichas gotas y se solubilizan en el  
agua (monoglicéridos y ácidos grasos), por lo que las gotas disminuyen su tamaño. Este descenso  
generalizado del tamaño se corresponde con un descenso generalizado de la intensidad de luz

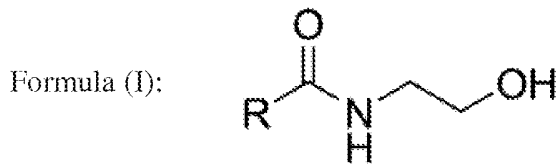
retrodispersada por la nanoemulsión. El valor de este cambio en la intensidad puede ir desde un valor apenas apreciable (0% lipólisis) a un valor máximo, equivalente a una lipólisis completa (100% lipólisis). Como se puede apreciar en la figura 2, la nanoemulsión de la invención posee un tamaño propio de las nanoemulsiones, que además permanece estable en un rango amplio de tiempo (Figura 2A), y que a su vez es convenientemente biodegradada cuando es mezclada con los jugos duodenales (Figura 2B), pudiendo producirse así la liberación de los compuestos administrados en ellas en el lugar apropiado. De esta forma y a lo largo de sucesivas experimentaciones se ha determinado que el ratio copolímero/fase oleosa en la nanoemulsión de la invención juega un papel fundamental a la hora de lograr nanoemulsiones estables en el tiempo, de bajo perfil toxicológico y una buena absorción a nivel intestinal. De este modo, la presente invención es la primera en aseverar que aquellas nanoemulsiones caracterizadas por comprender (a) una fase acuosa (b) una fase oleosa, que comprende un aceite, constituida por gotas de diámetro medio inferior a 500 nanómetros y c) un copolímero en bloques anfifílico; donde el ratio (p/p) copolímero/fase oleosa se encuentra entre 0,02 y 0,16, más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolímero/fase oleosa se encuentra entre 0,032 y 0,08 y aún más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolímero/fase oleosa es 0,04, resultan especialmente útiles para la administración oral de N-aciletanolaminas.

Así se ha demostrado que las nanoemulsiones de la invención son estables en el tiempo presentan un bajo perfil toxicológico y una buena absorción a nivel intestinal, lo que hace de estas nanoemulsiones un excelente vehículo farmacológico para la administración oral de N-aciletanolaminas.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una nanoemulsión aceite en agua (o/w) (de aquí en adelante “nanoemulsión” de la invención) adecuado para la administración de N-aciletanolaminas, que comprende:

- a. Una fase acuosa;
- b. Una fase oleosa, que comprende un aceite, constituida por gotas de diámetro medio inferior a 500 nanómetros;
- c. Un copolímero en bloques anfifílico; y

d. Un compuesto de formula (I):



- 5 donde el grupo R es un alquilo lineal (C11-C21) o un alquenilo lineal (C11-C21) con 1-6 dobles enlaces y donde el ratio (p/p) copolimero/fase oleosa se encuentra entre 0,02 y 0,16, más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolimero/fase oleosa se encuentra entre 0,032 y 0,08 y aún más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolimero/fase oleosa es 0,04.
- 10 En el contexto de la presente invención (p/p) hace referencia al porcentaje peso de surfactante/peso de la fase oleosa.

En el contexto de la presente invención, por nanoemulsiones se entiende a las estructuras compuestas de un aceite apto para su uso en alimentación, dispersado en agua como gotas de tamaño nanométrico, y a su vez, estabilizadas éstas por medio de un copolímero que impedirá la floculación o coalescencia de las gotas. Este tipo de nanoemulsiones está determinado por su tamaño de gota y distribución. De modo que atendiendo al diámetro medio de gota, por nanoemulsión se entiende aquellas emulsiones que presenten un diámetro medio de gota entre 20–500 nm, siendo micro o macro-emulsiones aquellas que presenten un diámetro medio de gota entre 0,5–100 µm. Preferiblemente, atendiendo al diámetro medio de gota, por nanoemulsión se entiende aquellas emulsiones que presenten un diámetro medio de gota inferior a 300 nm.

15

20

Se hace notar, que las nanoemulsiones de la presente invención, presentan una buena estabilidad física a largo plazo (sin floculación aparente o coalescencia) y no requieren una gran cantidad de surfactante como sucede con las microemulsiones. Así por ejemplo para una nanoemulsión aceite/agua (25%), una concentración de surfactante entre 0,5% y 6% (p/v), más preferiblemente entre 0,8% y 2% (p/v), sería suficiente para estabilizarla, muy inferior a valores típicos asociados con microemulsiones (10-20%), con los problemas de toxicidad que ello conllevaría.

25

- Por otro lado los porcentajes concretos de la fase acuosa de la nanoemulsión dependerán del método de preparación empleado, preferiblemente la fase acuosa se encuentra a una concentración entre un 5% y un 75% en peso por volumen total de la nanoemulsión (p/v). Ahora bien, en cualquier caso para que la nanoemulsión de la invención sea estable en el tiempo, de bajo perfil toxicológico y una buena absorción a nivel intestinal es necesario mantener el ratio (p/p) copolimero/fase oleosa entre 0,02 y 0,16, más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolimero/fase oleosa se encuentra entre 0,032 y 0,08 y aún más preferiblemente dicho ratio (p/p) copolimero/fase oleosa es 0,04.
- 5
- 10 Por otro lado, se hace notar que el surfactante empleado para la realización de la nanoemulsión de la presente invención son copolímeros en bloques anfifílicos, donde por anfifílico se entiende aquellas moléculas, sustancias, principios activos, estructuras o parte de ellas que poseen tanto propiedades hidrofóbicas como hidrofílicas.
- 15 De acuerdo con la IUPAC 1, los copolímeros en bloques son sustancias formadas por macromoléculas constituidas por bloques dispuestos en una secuencia lineal. Para este organismo, un bloque es una porción de una macromolécula, que comprende varias unidades constitutivas, que tiene al menos una característica que no está presente en las porciones adyacentes. Existen copolímeros formados por dos o por tres bloques, a los que se suelen simbolizar, respectivamente, como AB y ABA o BAB, donde A y B son los bloques poliméricos. También son posibles copolímeros en bloques constituidos por la repetición de unidades formadas por dos bloques, (AB)<sub>n</sub> y por la incorporación a un polímero de dos bloques de una tercera cadena (ABC). Otros tipos de copolímeros formados por bloques son los copolímeros injertados (en inglés, *graft copolymer*) y los copolímeros estrella.
- 20
- 25
- Entre los copolímeros en bloques con aplicaciones farmacéuticas se han de destacar los anfifílicos, que consisten de macromoléculas formados por bloques lipofílicos unidos a bloques hidrofílicos. Este tipo de copolímeros en bloques, que poseen propiedades tensoactivas, forman distintas clases de asociaciones, tales como micelas y estructuras líquido cristalinas, que pueden actuar como excelentes vehículos de principios activos. Entre los copolímeros en bloques
- 30

anfifílicos más utilizados en formulaciones farmacéuticas se encuentran los compuestos por bloques derivados de los óxidos de etileno (hidrofilicos) y de propileno, a los que se conoce con el nombre genérico de poloxameros y los nombres comerciales Pluronic (BASF) y Synperonic (ICI). Estos copolímeros poseen masas moleculares relativas comprendidas entre 1000 y 15000 y un contenido de bloques de poli(óxido de etileno) entre el 10 y el 80 por ciento en masa.

La hidratación de los bloques hidrofílicos de poli(óxido de etileno) se debe a su fácil acomodamiento en la estructura del agua. Esta hidratación es altamente dependiente de la temperatura, por lo cual la solubilidad y la formación de agregados de los polímeros en bloques que contienen este grupo polar pueden ser reguladas por variaciones de la temperatura. Estos polímeros, que poseen un bajo costo y son biocompatibles, pueden adoptar distintas estructuras cuando se dispersan en agua, las que dependen de la proporción de cada uno de los bloques y de su masa molecular relativa. Esta proporción también determina la solubilidad y el balance hidrofílico-lipofílico del polímero.

Los copolímeros Pluronic se designan con letras y números. La letra "L" se utiliza para los líquidos, "P" para los que se presentan como pastas y "F" (del inglés *flake*, escama) para los sólidos. El primer dígito, o los dos primeros en los números con tres dígitos, multiplicado por 300 es aproximadamente igual a la masa molecular relativa promedio de la parte lipofílica. El último dígito, multiplicado por 10, indica el porcentaje en masa aproximado de la parte hidrofílica. Así, por ejemplo, el Pluronic F68 es un copolímero sólido en el cual la masa molecular relativa aproximada de la parte hidrofóbica es 1800 (6 x 300) y la proporción en masa de la parte hidrofílica es aproximadamente 80% (8 x 10).

Así, en otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención, el copolímero en bloques anfifílico de la nanoemulsión de la invención es un poloxámero, más preferiblemente el copolímero en bloques anfifílico es el copolímero plurónico F68 ó el copolímero plurónico F127.

Por otro lado, tal y como ya se comentado anteriormente, la nanoemulsión de la invención se caracteriza por tener una fase oleosa, que comprende un aceite, constituida por gotas de un

diámetro medio inferior a 500 nanómetros, preferiblemente inferior a 300 nanómetros. En este sentido es importante resaltar que en el contexto de la presente invención, se entiende por diámetro medio aquel medido mediante la técnica Dynamic Light Scattering (DLS) que está definido por el diámetro hidrodinámico de una esfera que difunde a la misma velocidad que las partículas que se están midiendo. Esto proporciona el diámetro medio de las gotas, así como un índice de su polidispersidad, y es el método recomendado por la United States Pharmacopeia para la medida de tamaño de gotas de emulsiones lipídicas inyectables (método 729 USP).

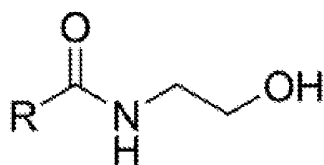
Adicionalmente, los aceites utilizados para constituir la fase oleosa de la nanoemulsión de la invención se pueden seleccionar entre aceites naturales, semisintéticos y sintéticos de uso farmacéutico tales como aceites de origen animal, vegetal, aceites hidrocarbonados o aceites de silicona. Aceites adecuados para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, aceite de escualeno, aceites de sabor, aceite de silicona, aceites esenciales, vitaminas insolubles en agua, isopropil estearato, butil estearato, octil palmitato, cetil palmitato, tridecil behenato, diisopropil adipato, dioctil sebacato, mentil antranilato, cetil octanoato, octil salicilato, isopropil miristato, cetoles de dicarpato de neopentilglicol, Cerafilos®, decil oleato, C12-C15 alquil lactatos, cetil lactato, lauril lactato, isostearyl neopentanoato, miristil lactato, isocetil estearoil estearato, octildodecil estearoil estearato, aceites de hidrocarburos, isoparafina, parafinas fluidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de colza, aceite de chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de lino, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palma fraccionado, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de semilla de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de salvado de arroz, cártamo, aceite de té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de macadamia, aceite de germen de trigo, aceite de almendra, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de avellana, aceite de girasol, aceite de cáñamo, aceite de bois, aceite de nuez de Kukui, aceite de aguacate, aceite de nuez, aceite de pescado, aceite de baya, aceite de pimienta de Jamaica, aceite de enebro, aceite de semilla, aceite de semilla de almendra, aceite de semilla de anís, aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez moscada, aceite de hoja de albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela, aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón, aceite de hoja de melaleuca, aceite de orégano, aceite de hoja de pachuli, aceite de hoja de menta, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de menta verde, aceite de hoja del árbol de té,

aceite de hoja de tomillo, aceite de hoja de té de Canadá, aceite de flor, aceite de camomila, aceite de salvia romana, aceite de clavo, aceite de flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de flor de jazmín, aceite de flor de lavanda, aceite de flor de mauka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja, aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza de casia, aceite de corteza de canela, aceite de corteza de sasafrás, aceite de madera, aceite de madera de alcanfor, aceite de madera de cedro, aceite de palo de rosa, aceite de sándalo, aceite de madera de jengibre, aceite de resina, aceite de ricino, aceite de mirra, aceite de piel, aceite de piel de Bérsgamo, aceite de piel de pomelo, aceite de piel de limón, aceite de piel de lima, aceite de piel de naranja, aceite de piel de mandarina, aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido linoleico, oleil alcohol, alcohol de isostearilo, oleato de etilo, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Rylo®, Peceol® y Maisine®, derivados sintéticos o semisintéticos de los mimos y combinaciones de los mismos. Preferentemente el aceite es aceite de girasol.

Por otro lado, tal como se ha definido anteriormente, las nanoemulsiones de la invención comprenden una N-aciletanolamina como principio activo. El término “principio activo” se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que se utiliza para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales. Así las nanoemulsiones de la presente invención resultan adecuadas para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad o dislipemia.

Las N-aciletanolaminas (NAEs) utilizadas en la presente invención, son amidas de ácidos grasos que actúan como mediadores endógenos de naturaleza lipídica. Así, en el contexto de la presente invención, una N-aciletanolamina es un compuesto que presenta la siguiente estructura química:

Formula (I):



donde el grupo R es un alquilo lineal (C11-C21) o un alquenilo lineal (C11-C21) con 1-6 dobles enlaces. En un aspecto preferido de la presente invención los grupos R pueden ser seleccionados de uno cualquiera de los siguientes grupos:

1.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ ,

2.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}$ ,
3.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}$ ,
4.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}$ ,
5.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}$ ,
- 5 6.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}$ ,
7.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ ,
8.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ ,
9.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4$ ,
10.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ ,
- 10 11.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9$ ,
12.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ ,
13.  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ ,
14.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3$ ,
15.  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3$ ,
- 15 16.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}$ ,
17.  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2$

Un tipo concreto de N-aciletanolamina es la N-oleiletanolamina., de ahí que en otro aspecto preferido del primer aspecto de la invención, la N-aciletanolamina es N-oleiletanolamina. El término N-oleiletanolamina (OEA), tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una NAE cuya estructura se describe en la figura 1B, que se genera de forma natural regulando la ingesta y la ganancia de peso corporal en todos los vertebrados. Es un ligando endógeno del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo alfa PPAR $\alpha$  que regula su actividad para estimular la lipólisis.

Por otro lado, un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para elaborar la nanoemulsión de la invención. En este sentido, se hace notar que los procedimientos de obtención de las nanoemulsiones de la invención son métodos sencillos que evitan condiciones drásticas como altas temperaturas. Además, tampoco es necesario llevar a cabo ningún tipo de reacción química para la obtención de los mismos, ya que la obtención del sistema implica interacciones no covalentes. Por tanto, se preserva así la integridad de las moléculas incorporadas al sistema, susceptibles de ser degradadas. En este sentido, para lograr la formación de las nanoemulsiones



de la invención se puede proceder a: i) disolver el/los copolímeros en agua bajo agitación suave; ii) añadir el aceite gota a gota a la fase acuosa producida en la etapa i), bajo agitación mecánica, produciendo una pre-emulsión; iii) reducir el tamaño de las gotas de la emulsión haciendo pasar en repetidas ocasiones la pre-emulsión de la etapa ii) por un homogeneizador de alta presión, 5 formándose así la nanoemulsión; iv) añadir bajo agitación suave a la nanoemulsión de la etapa iii) un compuesto de la fórmula (I).

Adicionalmente, otro aspecto de la presente invención se refiere a la nanoemulsión de la invención para su uso en terapia. Más concretamente, a una composición farmacéutica, que 10 comprende la nanoemulsión de la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En particular, la incorporación de N-aciletanolaminas en las nanoemulsiones de la invención origina composiciones, cuyas características en cuanto a su composición, propiedades y morfología, les convierte en excelentes candidatos para el área de la terapéutica, más concretamente para el tratamiento o prevención de la obesidad o de la 15 dislipemia. El tipo de N-aciletanolamina a incorporar en las nanoemulsiones de la invención será aquél con propiedades farmacoterapéuticas adecuadas de acuerdo con la aplicación terapéutica a la cual sea destinada la formulación. Así en una realización particular, la N-aciletanoamina es N-oleiletanolamina.

20 Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad. Alternativamente, la invención también se refiere al uso de una una composición que comprende la nanoemulsión de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la obesidad. Preferiblemente, la nanoemulsión de la invención para su uso en el 25 tratamiento o prevención de la obesidad se administra oralmente.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia. Alternativamente, la invención se refiere también al uso de una una composición que comprende la nanoemulsión de 30 la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la

dislipemia. Preferiblemente, la nanoemulsión de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia se administra oralmente.

Adicionalmente, en otro aspecto más, la invención se relaciona con un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad metabólica en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una composición que comprende la nanoemulsión de la invención.

El término "obesidad", según se usa en la presente invención, se refiere a la definición de obesidad proporcionada por la OMS basada en el índice de masa corporal (IMC), que consiste en la relación entre el peso de una persona (en kg) y el cuadrado de su altura en metros. Según este criterio, un IMC inferior a 18,5 kg/m<sup>2</sup> se considera como peso insuficiente o delgadez, un IMC de 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup> se considera normopeso, un IMC de 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup> se considera como sobrepeso en grado 1, un IMC de 30,0-39,9 kg/m<sup>2</sup> se considera obesidad o sobrepeso en grado 2 y un IMC mayor o igual a 40,0 kg/m<sup>2</sup> se considera como obesidad mórbida. Alternativamente, existen otros métodos para definir el grado de obesidad de un individuo tales como el diámetro de la cintura medida en el punto medio entre el límite inferior de las costillas y el límite superior de la pelvis (en cm), grosor de los pliegues de la piel y bioimpedancia, basada en el principio de que la masa magra transmite la electricidad mejor que la masa grasa.

El término "dislipemia", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier condición patológica caracterizada por una alteración en el metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos (colesterol, triglicéridos y similares) y lipoproteínas (lipoproteínas de alta densidad) en la sangre. Dislipemias que pueden ser tratadas con los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia de tipo I, IIa, IIb, III, IV, V, hiperquilomicronemia, hiperlipidemia combinada, etc.

El término "sujeto", según se usa en la presente invención incluye organismos vivos, tales como seres humanos, de sexo femenino o masculino, y de cualquier raza o edad; animales, por ejemplo monos, vacas, ovejas, caballos, cerdos, cabras, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

La cantidad de agentes activos (NAE) que será eficaz en el tratamiento de la obesidad o dislipemia puede determinarse por técnicas clínicas estándar basadas en la presente descripción. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá  
5 también de la vía de administración, y la gravedad de la afección, y debe decidirse conforme al juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto.

Para la administración oral, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in vitro. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para  
10 conseguir un intervalo de concentración circulante que incluya la IC50 (una medida de eficacia de la droga que indica cuánto de una sustancia es necesario para inhibir un proceso biológico dado) que se haya determinado en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en humanos. Las dosificaciones iniciales pueden estimarse también a partir de datos in vivo, p.ej., modelos animales, usando técnicas que son bien  
15 conocidas en el estado de la técnica. Alguien con una experiencia normal en la técnica podrá optimizar fácilmente la administración a humanos basada en los datos en animales.

A continuación, para una mayor comprensión de las características y ventajas de la presente invención, se hará referencia a una serie de ejemplos que de forma explicativa completan la  
20 descripción anterior, sin suponer en modo alguno que ésta se vea limitada a los mismos.

## **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

### **EJEMPLO 1. Preparación y obtención de nanoemulsión G-F68**

25 El aceite de girasol fue adquirido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.) y purificado mediante silicato de magnesio activado para eliminar ácidos grasos libres.

El poloxámero Plurónico F68 es un surfactante polimérico con un peso molecular de 8400 Da adquirido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

30

0,3 g de poloxámero Plurónico F68 fueron añadidos a 22.2 g de agua purificada MilliQ (0,054 mS) y disueltos en ella con la ayuda de un agitador magnético. Posteriormente, se añaden 7.5 g de aceite de girasol gota a gota mientras se agita mecánicamente mediante un agitador de alta velocidad Heidolph Diax 900, manteniéndose la agitación durante 4 minutos a 13000 rpm, formándose así la pre-emulsión. Esta pre-emulsión fue inmediatamente homogeneizada mediante el homogeneizador de alta presión Emulsiflex-C3 (Avestin, CA, EE.UU.) a 103 MPa. Este último proceso se repitió 8 veces.

### **EJEMPLO 2. Preparación y obtención de nanoemulsión G-F127**

El surfactante Plurónico F127 (poloxámero P407) es un copolímero tribloque con un peso molecular de 12600 g/mol, adquirido de Sigma-Aldrich. El método de preparación de nanoemulsiones con este surfactante es similar al explicado en el Ejemplo 1 para el Plurónico F68, con la única modificación de la cantidad de Plurónico empleado (en gramos). Con el fin de asegurar un correcto recubrimiento de las gotas de la nanoemulsión, la cantidad de Plurónico F127 será equivalente en moles a la de Plurónico F68, por lo que al ser mayor su peso molecular la cantidad añadida en gramos será superior. Así, en este caso la cantidad añadida de Plurónico F127 fue de 0.45 g.

### **EJEMPLO 3. Preparación de formulación con OEA**

A partir de la nanoemulsión G-F68, se añadirá la cantidad previamente determinada de OEA en función de la dosis a utilizar. En un vial conteniendo un volumen de nanoemulsión correspondiente a un 5% (v/v) del volumen total de la solución, se añade una cantidad pesada de OEA (estado sólido). Este vial se encontrará en agitación a temperatura 35-45°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la nanoemulsión conteniendo OEA se someterá a sonicación en un baño de agua convencional durante 5 minutos controlando la temperatura. A continuación se volverá a agitar el vial añadiendo gota a gota suero fisiológico (5% NaCl) hasta completar el restante 95% de volumen total de la solución de trabajo. Esta preparación se llevará a cabo en fresco el mismo día del trabajo experimental in vivo.

**EJEMPLO 4. Actividad biológica de nanoformulaciones de OEA con G-F68A** continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos experimentales in vivo realizados por los autores de la presente invención, que ponen de manifiesto la efectividad de las formulaciones de la invención.

## 5 **Animales de experimentación**

Ratas Wistar macho de 300-350 g fueron mantenidas individualmente en jaulas en unas condiciones de humedad y temperatura constantes, y con libre acceso a agua y comida estándar hasta llevarse a cabo los estudios de ingesta correspondientes. Los animales fueron manipulados por los experimentadores para su habituación.

## 10 **Compuestos y dosis**

Para el estudio de ingesta prolongado, una serie de soluciones de potencial uso para fármacos liposolubles relacionados con la conducta de ingesta fueron preparadas:

- a) Suero fisiológico.
- b) Tween 20 [10% en suero fisiológico v/v, obtenido de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido)].
- c) Nanoemulsión G-F68 (10% en suero fisiológico v/v).
- d) Nanoemulsión G-F127 (10% en suero fisiológico v/v).

Todas las soluciones fueron administradas diariamente en un volumen de 1 mL/kg vía intraperitoneal (i.p.) durante 3 semanas.

- 20 Para el estudio de ingesta agudo, la nanoemulsión G-F68 fue preparada en suero fisiológico al 5%. Volumen de administración 1 mL/kg vía i.p.

Respecto a los estudios agudos con OEA, el compuesto se obtuvo de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). Se administró en una solución compuesta de la nanoemulsión G-F68 (5%) y suero fisiológico (95%) cuya preparación se llevaba a cabo el mismo día experimental. Las dosis  
25 empleadas fueron:

- a) 1, 5 y 10 mg/kg de OEA para los ensayos agudos de ingesta vía intraperitoneal. Volumen de administración 1 mL/kg
- b) 1, 10 y 50 mg/kg de OEA para los ensayos agudos de ingesta vía oral por intubación intragástrica (gavage, i.g.). Volumen de administración 3 mL/kg.

5

### **EJEMPLO 5. Estudio prolongado de ingesta y determinación bioquímica en plasma de nuevas nanoemulsiones: toxicidad y efectos metabólicos**

Las nanoemulsiones G-F68 y G-F127 han sido evaluadas *in vivo* en ratas Wistar macho durante 3 semanas frente a otro vehículo habitualmente empleado para fármacos liposolubles: Tween 20 (10% en salino v/v). Utilizando suero fisiológico como grupo control de referencia, los animales tratados con las presentes nanoemulsiones mostraron un perfil toxicológico significativamente mejorado respecto a aquellos tratados con Tween 20 y similar a los tratados únicamente con suero.

#### **1. Evolución peso**

La administración de Tween 20 indujo una menor ganancia de peso en estos animales en comparación con aquellos que recibían salino. Esta menor ganancia resultó significativa a partir de la segunda semana (\* $P < 0,05$ ), incrementándose la tercera (\*\* $P < 0,01$ ). Sin embargo, la administración de ambas nanoemulsiones no produjo efectos sobre la ganancia de peso respecto al grupo tratado con salino (figura 3).

#### **2. Bioquímica en plasma**

Los animales fueron sacrificados tras el tratamiento con las diferentes soluciones por decapitación, previa anestesia (pentobarbital 200 mg/kg, i.p.). La sangre troncal recogida fue centrifugada (2000xg, 15 min, 25°C) y se extrajo el plasma en criotubos para preservar inmediatamente a -20°C. El análisis bioquímico del plasma mostró un incremento significativo de colesterol (\*\* $P < 0,01$ ), triglicéridos (\* $P < 0,05$ ), y transaminasas [GPT (\*\* $P < 0,01$ ) y GOT (\*\* $P < 0,01$ )] en aquellos animales tratados con Tween 20 respecto a los tratados con salino. Sin embargo, los animales tratados con las nuevas nanoemulsiones mostraron una significativa mejoría de estos parámetros frente al Tween 20: a) G-F68 mostró un incremento significativo del

colesterol respecto al grupo salino (\*P<0,05), pero indujo una caída muy acusada de triglicéridos (####P<0,001) y transaminasas [GPT (#P<0,05) y GGt (#P<0,05)] respecto al Tween 20; b) G-F127 indujo una reducción de creatinina (#P<0,05), colesterol (###P<0,01) y GPT (#P<0,05). Ver Tabla 1.

5 **Tabla 1.** Parámetros bioquímicos en plasma de ratas Wistar macho (N=8 por grupo) tras la administración diaria de salino, Tween 20 ó nanoemulsiones durante 3 semanas.

Parámetros bioquímicos en plasma	Tratamiento (3 semanas, i.p.)			
	Salino	Tween20 (10% en salino)	G-F68 (10% en salino)	G-F127 (10% en salino)
Úrea (mg/dL)	30.2 ± 1.6	31.8 ± 0.6	34.7 ± 1.6	33.8 ± 1.8
Creatinina (mg/dL)	0.50 ± 0.03	0.43 ± 0.01	0.51 ± 0.05	0.55 ± 0.04 <sup>#</sup>
Ácido Úrico (mg/dL)	0.63 ± 0.01	0.61 ± 0.03	0.67 ± 0.01	0.60 ± 0.02
Colesterol (mg/dL)	78.5 ± 1.8	88.2 ± 0.5 <sup>**</sup>	85.1 ± 1.8 <sup>*</sup>	80.8 ± 1.4 <sup>##</sup>
HDL-C (mg/dL)	23.8 ± 0.9	25.0 ± 0.9	24.8 ± 1.2	24.0 ± 0.9
Triglicéridos (mg/dL)	121.7 ± 6.1	141.0 ± 5.2 <sup>*</sup>	115.0 ± 0.9 <sup>***</sup>	125.8 ± 7.9
GPT (U/L)	37.7 ± 0.6	42.8 ± 1.4 <sup>**</sup>	38.0 ± 0.9 <sup>#</sup>	39.0 ± 1.0 <sup>#</sup>
GOT (U/L)	88.8 ± 2.4	107.0 ± 5.5 <sup>**</sup>	97.7 ± 4.0	94.2 ± 4.9
GGt (U/L)	5.30 ± 0.30	5.92 ± 0.36	4.70 ± 0.18 <sup>#</sup>	5.66 ± 0.44

Los valores representan medias ± SEM (error estándar de la media). Los datos fueron analizados por ANOVA (1 vía) y post-tests Bonferroni. \* P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 vs. Grupo control salino; #P<0,05, ##P<0,01 y ####P<0,001 respecto al grupo Tween 20. Abreviaturas: HDL-C: Colesterol-lipoproteína de alta densidad; GPT: Glutamato-piruvato transaminasa; GOT: Glutamato-oxaloacetato transaminasa; GGt: Gamma glutamil transpetidasa.

#### EJEMPLO 6. Efectos agudos sobre ingesta tras la administración sistémica y oral de OEA

15 Se valoró la actividad biológica relativa a la inducción de saciedad y control de la ingesta de la N-aciletanolamina OEA usando la nanoemulsión G-F68 como sistema de transporte (vehículo). Los experimentos se llevaron a cabo en animales habituados al protocolo experimental. Para este

fin, 48 horas antes de cada ensayo se retiraba el material de base (arena o serrín), y se situaban pequeños contenedores con comida dentro de las jaulas durante 4 horas. Pasada esta fase inicial, los animales fueron privados de comida durante 24 horas, siempre con acceso libre al agua. Una vez establecidos los grupos de tratamiento, a los 15 minutos de la administración aguda se colocaban los contenedores con una cantidad de comida conocida (normalmente 30-40 g) y una botella de agua fresca. Estos contenedores de comida se pesaron a diferentes tiempos durante las primeras 4 horas y a las 24 horas después de su tratamiento agudo.

### **1. Efectos de la nanoemulsión G-F68 sobre la conducta de ingesta**

En primer lugar se demostró que una administración aguda de G-F68 (1 mL/kg, i.p.), no afectaba la conducta de ingesta en ratas en ayunas, frente a aquellas que recibieron suero fisiológico (Figura 3).

Transcurridas 24 horas de la inyección tampoco se observaron diferencias en la cantidad de comida ingerida por ambos grupos experimentales.

### **2. Efectos de la administración sistémica de OEA en la nanoemulsión G-F68**

Una vez descartados efectos sobre ingesta de la nanoemulsión per se, la OEA fue administrada usando G-F68 (5% en salino) vía intraperitoneal en un volumen de 1 mL/kg, controlando la comida ingerida a diferentes tiempos durante 24 horas tras la administración del fármaco. De este modo, se pudo observar y reproducir la actividad anorexigénica descrita para este mediador lipídico de saciedad usando estas nanoemulsiones (Rodríguez de Fonseca y col., 2001; Fu y col., 2003).

Como ilustra la Figura 5, la administración sistémica de OEA indujo una reducción significativa del consumo de comida con dosis de 5 mg/kg (\*\*P<0,001 a los 15 min; \*P<0,05 a los 30 min) y 10 mg/kg (\*\*P<0,001 a los 15 min; \*\*P<0,001 a los 30 min; \*\*P<0,001 a los 60 min) comparado con los tratados con la nanoemulsión únicamente.

Transcurridas 24 horas de la administración aguda de las diferentes dosis de OEA, no se observó diferencias de ingesta acumulada respecto a los animales tratados con vehículo (G-F68).

### **3. Efectos de la administración oral de OEA en la nanoemulsión G-F68**



Adicionalmente se llevó a cabo el tratamiento agudo de ratas en ayunas con OEA administrada vía oral (i.g.) en un volumen de 3 mL/kg. Estos animales fueron previamente habituados a la técnica de intubación intragástrica por sonda rígida utilizando suero fisiológico.

5 La administración aguda de diferentes dosis de OEA indujo un efecto inhibitor en el consumo de comida de modo dosis-dependiente respecto al grupo de ratas control (tratadas con vehículo G-F68).

10 La administración oral por gavage de OEA indujo una reducción significativa del consumo de comida con dosis de 1 mg/kg (\*\*P<0,01 a los 240 min), 10 mg/kg (\*P<0,05 a los 240 min) y 50 mg/kg (\*\*P<0,01 a los 15 min; \*P<0,05 a los 30 min; \*P<0,05 a los 60 min; \*\*P<0,01 a los 120 min; \*\*\*P<0,001 a los 240 min; \*\*P<0,01 a las 24 h) comparado con los animales tratados con la nanoemulsión G-F68 únicamente (figura 6)

15 Cabe destacar que los presentes datos de administración oral de OEA con la nueva nanoemulsión G-F68 muestran un efecto inhibitor de ingesta con dosis efectivas inferiores a las descritas en la literatura, así como una mayor duración de este efecto. Estos datos demostrarían la capacidad de estas nanoformulaciones para liberar OEA de forma controlada gracias a la composición de la nanoemulsión.

20 Por tanto, la administración con estas nuevas nanoemulsiones de NAEs y fármacos liposolubles relacionados con estas moléculas, representa un sistema de transporte, liberación y actividad eficaz y seguro. Esto tiene aplicación directa en los campos de la biomedicina y de la farmacia, ya que se podrían administrar de manera apropiada estas aciletanolamidas para fines terapéuticos. Por ejemplo, se puede utilizar el efecto saciante de OEA ya demostrado para esta formulación con el fin de reducir la ingesta calórica, y por tanto, disminuir los graves efectos sobre la salud derivados de ésta: obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc.

## REIVINDICACIONES

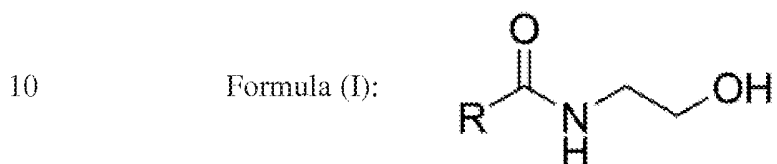
1. Una nanoemulsión del tipo aceite en agua (o/w) adecuada para la administración de N-aciletanolaminas, que comprende:

a. Una fase acuosa;

5 b. Una fase oleosa que comprende un aceite constituida por gotas de diámetro inferior a 500 nanómetros;

c. Un copolímero en bloques anfifílico; y

d. Un compuesto de formula (I):



donde el grupo R es un alquilo lineal (C11-C21) o un alquenilo lineal (C11-C21) con 1-6 dobles enlaces y donde el ratio (p/p) copolimero/fase oleosa se encuentra entre 0,02 y 0,16.

15 2. La nanoemulsión según la reivindicación 1, donde el ratio (p/p) copolimero/fase oleosa se encuentra entre 0,032 y 0,08.

3. La nanoemulsión según la reivindicación 1, donde el ratio (p/p) copolimero/fase oleosa es 0,04.

20

4. La nanoemulsión según la reivindicación 1, donde la concentración del copolimero se encuentra a una concentración de un 1% en peso del volumen total de la nanoemulsión (p/v).

25 5. La nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el copolímero en bloques anfifílico es un poloxámero.

6. La nanoemulsión según la reivindicación 5, en donde el poloxámero se selecciona de la lista que consiste en plurónico F68 y plurónico F127.
- 5 7. La nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase oleosa se selecciona de la lista que consiste en aceite de girasol, cacahuete, algodón, oliva, ricino, soja, cártamo, palma,  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno o cualquier combinación de los mismos.
- 10 8. La nanoemulsión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fase oleosa consiste en aceite de girasol.
9. La nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto de fórmula (I) es N-oleiletanolamina.
- 15 10. Procedimiento para la obtención de la nanoemulsión tal y como se define en la reivindicación 1, que comprende: i) disolver el/los copolímeros en agua bajo agitación suave; ii) añadir el aceite gota a gota a la fase acuosa producida en la etapa i), bajo agitación mecánica, produciendo una pre-emulsión; iii) reducir el tamaño de las gotas de la emulsión haciendo pasar en repetidas ocasiones la pre-emulsión de la etapa ii) por un  
20 homogeneizador de alta presión, formándose así la nanoemulsión; iv) añadir bajo agitación suave a la nanoemulsión de la etapa iii) un compuesto de la fórmula (I).
11. La nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en terapia.

12. Uso de la nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad.

5

13. Uso de la nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia.

10

14. Uso de la nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia, donde dicha dislipemia se selecciona de la lista que consiste en hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia de tipo I, IIa, IIb, III, IV ó V, hiperquilimicronemia o hiperlipidemia combinada.

15

15. Composición farmacéutica que comprende la nanoemulsión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20

16. Nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad por vía de administración oral.

17. Nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia por vía de administración oral.

18. Nanoemulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento o prevención de la dislipemia, donde dicha dislipemia se selecciona de la lista que consiste en hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia de tipo I, IIa, IIb, III, IV ó V, hiperquilimicronemia o hiperlipidemia combinada y dónde la nanoemulsión se administra oralmente.

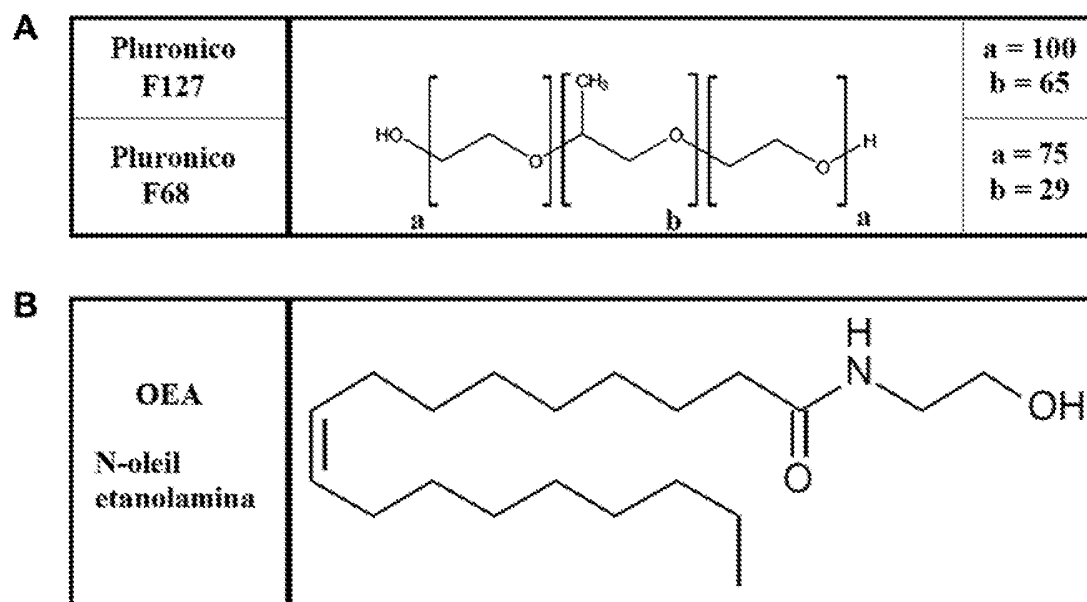


FIGURA 1

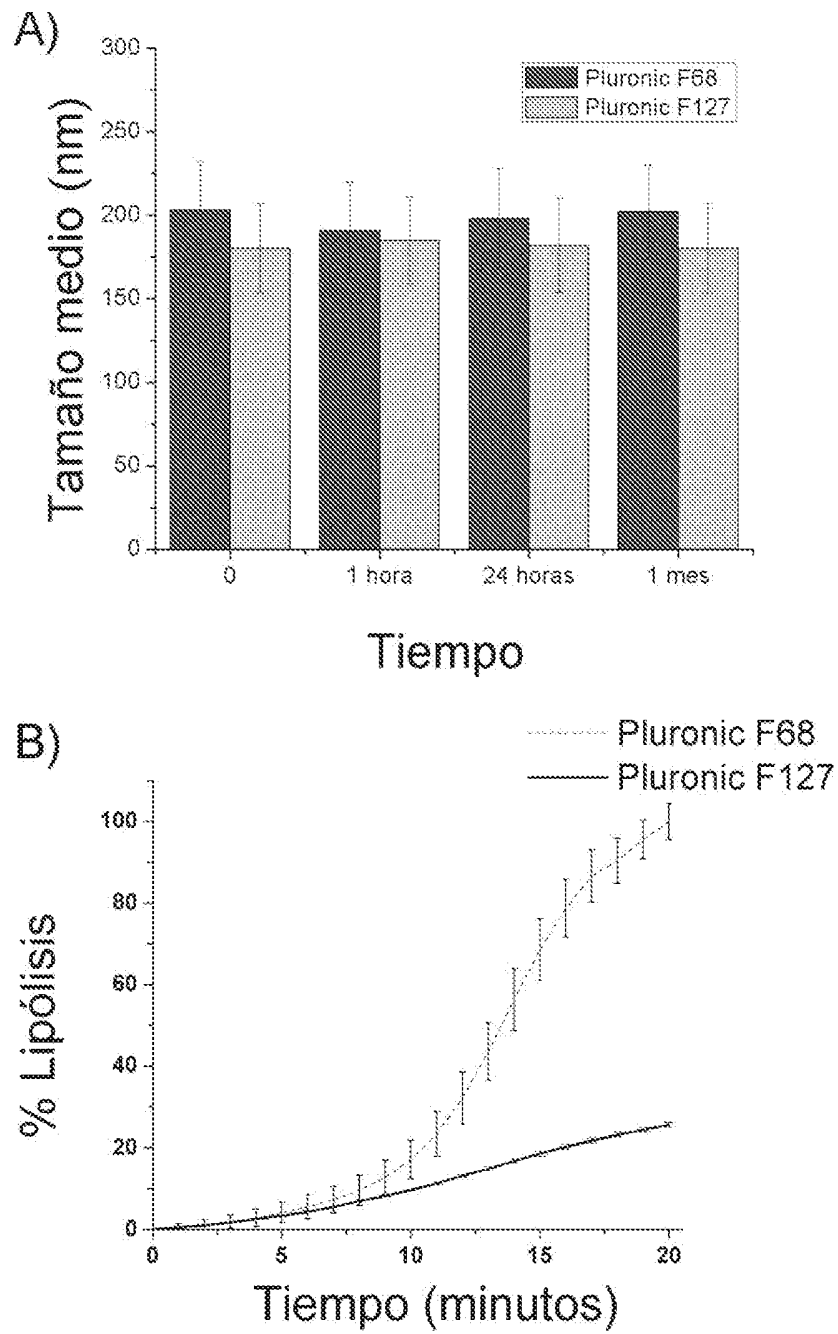


FIGURA 2

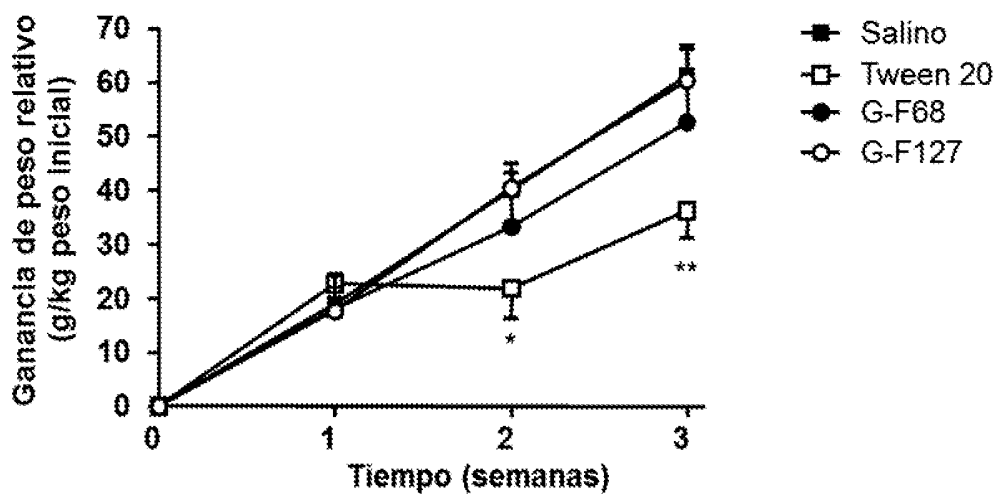


FIGURA 3



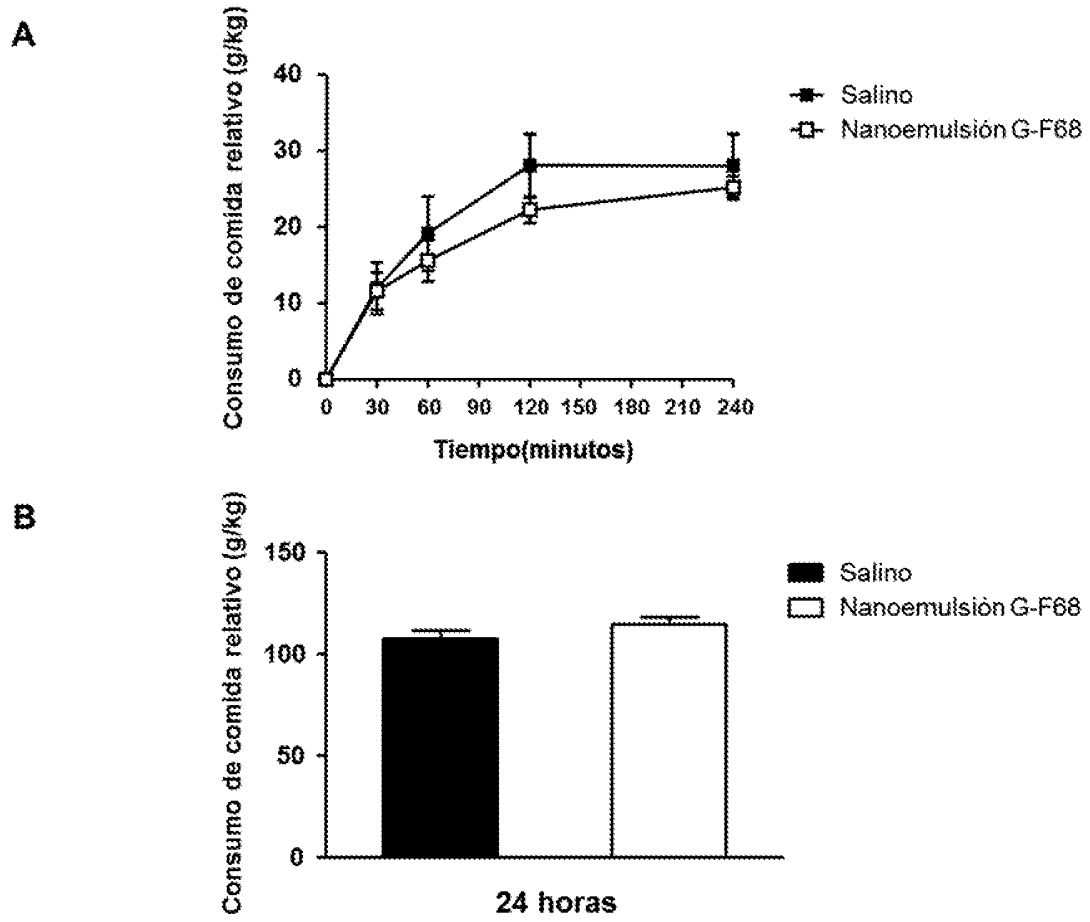


FIGURA 4

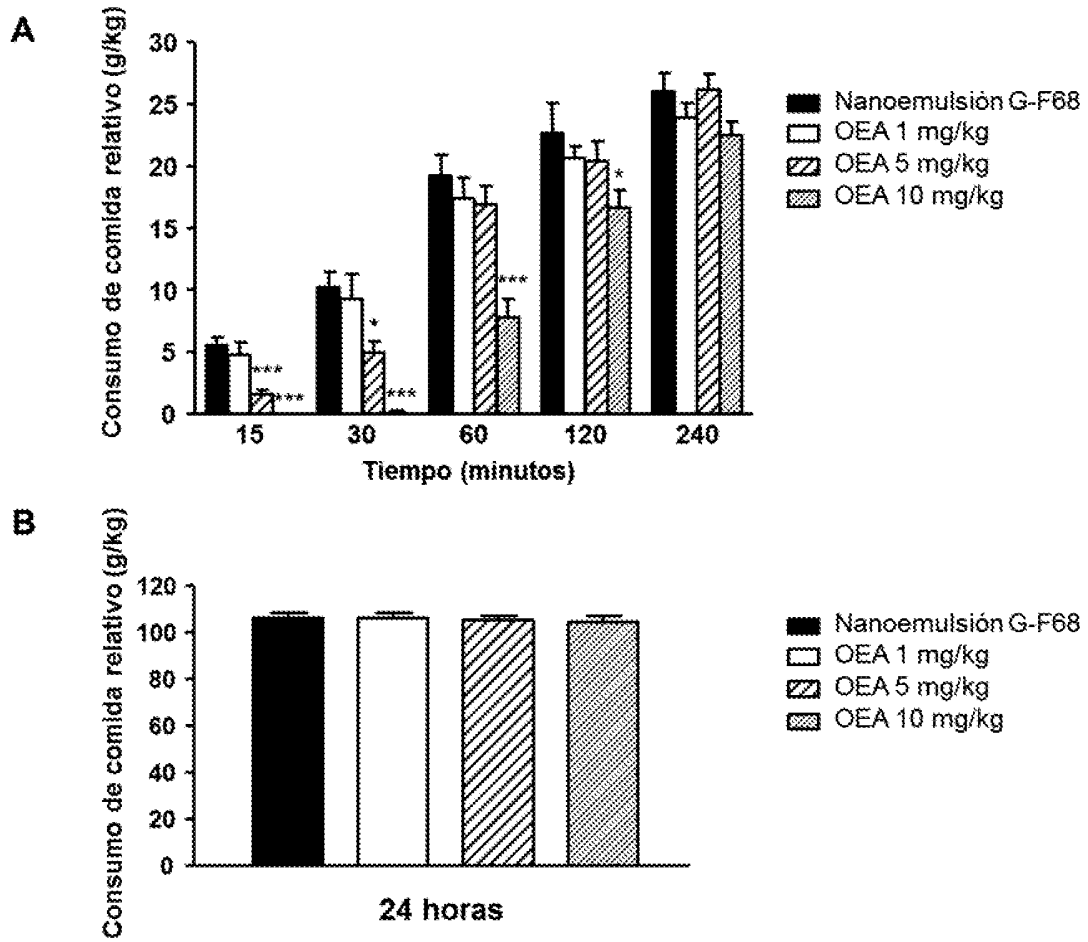


FIGURA 5

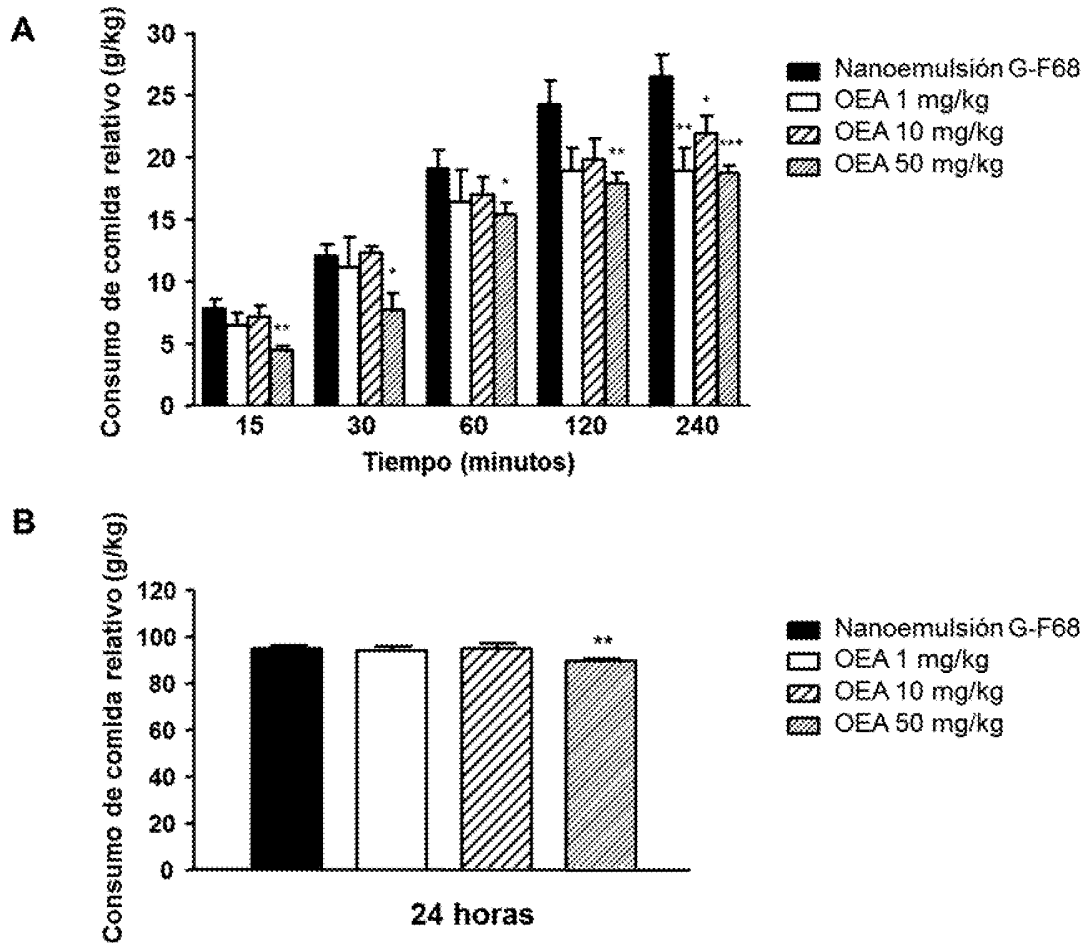


FIGURA 6