NANOEMULSION DE ÁCIDO 18P-GLICIRRETÍNICO

Campo de la invención

La presente invención refiere a formulaciones y formas farmacéuticas derivadas de una nanoemulsión que contienen como fármaco el ácido 18β-glicirretínico. Específicamente, la invención proporciona una formulación farmacéutica de una nanoemulsión gelificada, con una concentración de ácido glicirretínico que comprenden desde 0.001% a un 30% P/P (porcentaje en peso). Las distintas formulaciones son diseñadas para el tratamiento de los distintos padecimientos sobre los cuales se sabe que el fármaco tiene un efecto terapéutico.

Los efectos terapéuticos asociados al fármaco, y por ende a las formulaciones, incluyen actividad antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana, hepatoprotectora, padecimientos de la piel y anticancerígeno.

Las presentes formulaciones están diseñadas preferentemente, para el tratamiento de padecimientos derivados de las infecciones virales preferentemente del virus del papiloma humano (VPH). Entre las afecciones por el VPH se encuentran la infección viral por VPH, coilocitos, papilomas, lesiones intraepiteliales cervicales en sus distintas etapas, carcinomas del tracto genitourinario, perianal y del recto.

Antecedentes de la invención

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus de ADN no envueltos, relativamente pequeños, un diámetro aproximado de 52-55 nm, que están asociados a lesiones epiteliales benignas y malignas, incluyendo >95% de los cánceres cervicales y ~20% de cánceres de cabeza y cuello. Existen más de 200 genotipos de VPH que infectan y se replican en el epitelio cutáneo o de la mucosa, lo que induce lesiones benignas, incluidas las verrugas que son autolimitantes y normalmente regresan con el tiempo.

El ciclo de replicación del VPH y su producción de viriones están estrechamente relacionado a la diferenciación de las células epiteliales. Los VPH infectan inicialmente las células poco diferenciadas, proliferativas y las del epitelio estratificado. Inicialmente el genoma viral establece su residencia como un plásmido nuclear con un bajo número de copias, un subconjunto de genes virales (los genes tempranos) se expresan en bajos niveles y no se genera viriones. Sin embargo, el ciclo de vida del virus inicia cuando las células basales son infectadas y se dividen y las células hijas migran al compartimiento suprabasal para culminar la diferenciación.

Actualmente, existen tratamientos físicos y químicos para el control de las infecciones de VPH que producen lesiones precancerosas y de neoplasias intraepiteliales. Por el lado de

los métodos físicos se utilizan técnicas que tienen como fin la eliminación de la zona de infección, con métodos como crioterapia, electro-cauterización, cono con electrocirugía, asa diatérmica, cono con láser de CO_2, fotovaporizado con láser de CO_2 y cono de cuello uterino con bisturí. En cuanto a los tratamientos químicos se han utilizado medicamentos como el ácido tricloroacético, podofilina, podofilotoxina, 5-fluoruracilo (5-FU) e imiquimod, los cuales han sido fármacos con buena efectividad y seguridad, pero solo para el tratamiento inicial de verrugas anogenitales. Estas opciones de tratamiento tienen un impacto limitado en las tasas de curación y la supervivencia a largo plazo.

El ácido glicirricínico (AG) es un fármaco que se ha utilizado en algunas formulaciones para el tratamiento de infecciones por VPH. Este es extraído de las raíces de la planta *Glycyrrhiza uralensis* o conocida comúnmente como regaliz. A esta planta se le han atribuido propiedades antivirales, citotóxicas, antimicrobiales, inhibitorias enzimáticas, antiinflamatorias, antioxidantes y analgésicas. Existen reportes que describen que extractos de esta planta han sido utilizados en la medicina antigua para el tratamiento de enfermedades como tos, asma, patologías del pulmón, enfermedades del tórax, enfermedades del hígado, trastornos del intestino, estomago, indigestión, enfermedades arteriales,

enfermedades del sistema urinario, enfermedades de la vejiga urinaria, dolor renal, expulsión de cálculos renales, heridas, úlceras, granulomas, enfermedades de los ojos y fiebre. Así mismo existen casos documentados donde extractos de la planta se han utilizado para la curación de úlceras y para el tratamiento de dolores espasmódicos provocados por gastritis crónica.

También se ha documentado su uso como agente antineoplásico en melanoma y cáncer gástrico, actividad antiaterogénica, efectos antioxidantes, efectos hipolipidémicos, tratamiento de la dermatitis atópica. En experimentos *in vitro* se ha demostrado su capacidad como agente antiviral contra el virus de la hepatitis B, Epstein Barr virus, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), coronavirus, virus de la encefalitis japonesa, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del herpes simple.

Existen en el mercado algunas formulaciones con el AG como principio activo para el tratamiento del VPH y sus enfermedades afines. Por ejemplo, la formulación EPIGEN® es una solución que contiene en su composición AG en una concentración de 0.001 g/mL, etiquetada como agente antiviral especialmente para el tratamiento de infección por VPH, indicado para infecciones Herpes Simple tipo 1 (labial), Herpes Simple tipo 2 (genital) y Herpes Zoster.

Algunas solicitudes de patente mencionan formulaciones con AG como principio activo, por ejemplo, la Patente MX 351117 B describe una formulación compuesta por AG en una cantidad de 0.01 a 0.2 g/mL, polímero termorreversible tipo POE-POP-POE en un 20 a 30 %, ácido tricloroacético en un 0.5 al 2.0%, metil parabeno y propilenglicol. La solicitud mexicana PA/E/2006/019396 menciona una formulación compuesta por PF-127 (20 – 30%), AG en concentraciones de 0.001 a 0.5 g/mL y propilenglicol.

Aunque muchas de las propiedades farmacológicas se le atribuyen al AG, ciertas actividades farmacológicas se deben al ácido 18β-glicirretínico(18β-AG), que es la aglicona resultante de la hidrólisis del AG. Cuando el AG es administrado por vía oral no hay biodisponibilidad de este, sin embargo, es absorbido en forma de 18β-AG después de su hidrólisis por bacterias intestinales. Esto sugiere que, para el tratamiento de ciertos padecimientos, el 18β-AG es el compuesto activo funcional y no el AG.

El ácido 18β-glicirretínico (18β-AG) es un triterpenoide pentacíclico, su fórmula molecular es $C_{30}H_{46}O_4$. Se le conoce con los nombres de ácido (20β) -3β-hidroxi-11-oxo-olean-12-en-29-oico, ácido (3β, 20β) -3-hidroxi-11-oxo-olean-12-en-29-oico, ácido 3β-hidroxi-11-oxooleano-12-en-30-oico, ácido 18β-glicirrético, ácido 18β-glicirretínico, biosona,

enoxolona, ácido glicirrético, glicirretina, ácido glicirretínico, GM 1658, NSC 35347, ácido olean-12-en-29-oico, 3-hidroxi-11-oxo-, (3β, 20β) -, ácido olean-12-en-30-oico, 3β-hidroxi-11-oxo-, PO 12, STX 352, ácido subglicirrélico, ácido uralenico. Existen dos estereoisómeros del ácido glicirretínico, 18α- y 18β. Aunque se conocen algunas propiedades farmacológicas del estereoisómero 18α, generalmente este compuesto es más tóxico para los humanos, por lo que el estereoisómero 18β-AG es el comúnmente utilizado para fines terapéuticos.

Aunque a ambos compuestos, el AG y el 18β-AG, se les atribuyen las mismas propiedades farmacológicas generales, por ejemplo, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobiales, antivirales, inmunorregulatorias, entre otras, estas se deben a mecanismos biológicos y moleculares diferentes y dependientes de la patología en cuestión. Por ejemplo, para el caso de las propiedades anticancerígenas, se sabe que el AG actúa a través de la inhibición de enzimas como el tromboxano sintetasa, la HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1 protein*) y la proteína TNF-α. Asimismo, se sabe que el AG induce apoptosis en células cancerígenas a través de la vía dependiente de caspasas y mitocondria. Para el caso del 18β-AG, este actúa disminuyendo la expresión de proteínas como la NF-κ, el factor de crecimiento vascular endotelial y la proteína MMP-9. También

se conoce que el compuesto induce la apoptosis y el arresto del ciclo celular en la fase G2.

Para el caso del efecto antiviral se sabe que cada compuesto actúa de manera diferente para cada tipo de virus. Se ha observado un efecto antiviral del AG sobre los títulos del virus de Hepatitis C (HCV) impidiendo la liberación de las partículas virales infecciosas dando como resultado una reducción del 50%, y evita que el virus ingrese a la célula. Demostrando que el AG inhibe la expresión del gen central del VHC 3A, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Se ha reportado que el AG inhibe la replicación del virus herpes simple tipo 1 en células humanas, e inhibe la replicación del VIH. Por otra parte, inhibe al virus del herpes simple (HSV) disminuyendo la adhesión celular, e inhibe el virus de la influenza impidiendo la interacción de las macromoléculas virales y las proteínas de la célula infectada. Además, se sabe que inhibe al VIH previniendo su replicación y al virus H5N1 lo inhibe controlando la respuesta proinflamatoria que este provoca y necesita para replicarse.

En cuanto al 18β-AG se sabe que este compuesto interfiere con la replicación del Rotavirus hasta un 99% de la infección cuando se probó en cultivos infectados, reduciendo la cantidad de las proteínas virales VP2, VP6 y NSP2. También inhibe el VIH-1 reduciendo la acumulación del antígeno viral

p24 y protegiendo a las células de la acción cito patológica del virus.

Estas diferencias en mecanismos de acción sugieren que para una patología determinada los dos fármacos pueden tener diferentes mecanismos y desempeños en el tratamiento. Por ejemplo, para el tratamiento de infecciones por VPH, lesiones precancerosas y cáncer cervicouterino nuestros experimentos demuestran que el 18β-AG tiene un mejor efecto terapéutico que el AG, cuando se comparan su efecto citotóxico en distintas líneas celulares.

Por lo anterior, surge la necesidad de crear formulaciones y formas farmacéuticas que tengan el fármaco 18β-AG, para el tratamiento de los padecimientos en cuestión. Una de las limitaciones del 18β-AG, es que es un compuesto de difícil disolución en muchos compuestos solubilizantes farmacéuticamente aceptados, ya que, es insoluble en agua. Además, el compuesto tiene una nula permeación en las capas epiteliales lo que dificulta la elaboración de una formulación efectiva, como sería el caso del uso en el tratamiento de infecciones con un tropismo tisular epitelial. Las infecciones de mayor interés en salud publica son las infecciones virales que afectan el tracto genitourinario. Algunas de estas son causadas por miembros de las familias *Papillomaviridae, Herpesviridae, Flaviviridae, Rotaviridae, etc.*

Por lo tanto, surge la clara necesidad de una forma farmacéutica capaz de permear estas capas epiteliales para poder tener un efecto en la disminución y/o inhibición de la enfermedad.

Los sistemas de liberación de fármacos por vía vaginal incluyen soluciones, semisólidos (cremas, ungüentos y geles) y formulaciones sólidas (tampones, capsulas, tabletas, supositorios, películas, esponjas, polvos y dispositivos de liberación controlada de fármacos como anillos vaginales). La eficacia de estos sistemas de liberación dependerá de su capacidad de alcanzar la concentración local adecuada del fármaco en el sitio de acción, sus propiedades mucoadhesivas y su compatibilidad con la microbiota vaginal. Para alcanzar una concentración deseada debe de lograrse pese a las variaciones intrínsecas de esta zona anatómica como el grosor epitelial, los cambios en la composición fisicoquímica del microambiente vaginal que son consecuencia de las condiciones fisiológicas (menstruación, adolescencia, infecciones, hábitos socioculturales, actividad sexual, entre otras). Por otra parte, las secreciones vaginales pueden reducir la biodisponibilidad del fármaco.

Dado lo anterior, es necesaria una formulación que sea efectiva tanto en concentración y como en intervalo corto de tiempo; es decir, la formulación deberá tener una capacidad

de permeación adecuada en un corto tiempo.

Para el caso del 18β-AG es importante obtener una formulación cuya permeación sea incrementada, pues el compuesto 18β-AG por sí solo tiene propiedades fisicoquímicas indeseables como pobre capacidad lipofílica, pobre biodisponibilidad y baja solubilidad en agua, que disminuyen drásticamente su perfil de absorción percutánea (Hao J.,et al. Int J. Pharmaceut. 399, 102–108 (2010))(Li, S., et al. Drug Dev. Ind. Pharm. 38, 855–865 (2012)). Es ampliamente conocido que la penetración de un compuesto en la piel depende del logaritmo del coeficiente de reparto (log P), que es un indicador de la lipofilia de un compuesto y su peso molecular. Esto es causado principalmente por las propiedades lipofílicas de la capa externa y muerta de la piel: el estrato córneo. Los compuestos con un valor log P de aproximadamente 1 a 4 y pesos moleculares inferiores a 500 Da pueden penetrar fácilmente a través de la piel, y los fármacos utilizados para aplicación tópica están diseñados en consecuencia. Aunque la masa molar del 18β-AG es inferior a 500 Da, más precisamente 470.7 Da, su valor de log P es bastante alto (6.574), por lo tanto, se necesita una estrategia para aumentar la permeabilidad del 18β-AG.

Una forma de aumentar la permeabilidad de los fármacos es a través de formulaciones que constituyan micro y nano emulsiones. Una emulsión es un sistema líquido constituido

por dos o más líquidos inmiscibles, en el cual gotas de un líquido (la fase dispersa) son dispersas en otro líquido (la fase continua), y el límite entre ambas fases es conocido como interfase. Por otra parte, las micro- y nanoemulsiones son emulsiones con alto contenido de surfactante y cosurfactante, capaces de formar sistemas líquidos dispersos, traslucidos y que su principal característica es su tamaño reducido de partículas que comprende de 1 nanómetro (nm) a 1 micrómetro (µm). Se diferencian de otros sistemas como las nanopartículas, liposomas o vesículas, debido a que estos son partículas sólidas o semisólidas dispersas en una fase líquida o gaseosa. Debido a su reducido tamaño de partícula, las nanoemulsiones son formulaciones que pueden penetrar a través de diferentes membranas o tejidos y potencializar la biodisponibilidad del fármaco o los fármacos que tienen una reducida permeabilidad, ya sea por vía tópica u oral.

Existen algunas formulaciones y formas farmacéuticas para el tratamiento de infecciones por VPH, lesiones precancerosas y cáncer cervicouterino que contienen el 18β-AG como principio activo. Por ejemplo, la solicitud MX/a/2017/010806 menciona una forma farmacéutica en gel con una formulación que se compone de un gel termorreversible tipo POE-POP-POE, 18β-AG, una fitoalexina (resveratrol), una biguadina (metformina) y extracto de *Lactobacillus sp.*

Utilizando 18β-AG en una concentración de 0.1 a 0.75 g/mL. En el anterior ejemplo, el resveratrol es inestable fisicoquímicamente a temperatura ambiente (lo que reduce su vida media y compromete la formulación en anaquel). Además, esta formulación no comprende una nanoemulsión, pues solo se trata de una solución de 18β-AG gelificada.

S. Li *et. al.* (Skin Pharmacol Physiol 2012; 25:257-268) menciona la obtención de una formulación que consiste en un hidrogel con un sistema de liposomas de 18β-AG y lisina en concentraciones de 0.3 al 0.9 % P/P y con tamaños de partícula de 150 µm. A diferencia de una micro o nanoemulsión, los liposomas están compuestos de fosfolípidos y no necesariamente están suspendidos en una fase acuosa u oleosa.

Puglia C. *et al.* (Drug delivery, 2010, vol. 17, no 3, p. 123-129.) mencionan una nanoemulsión de 18β-AG con tamaños de partícula de 180 a 240 nm, una concentración de 0.5%, una reducida estabilidad y una permeabilidad de 0.60±0.08µg/h/cm2, pensada para su uso como antinflamatorio.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a una nanoemulsión que potencializa la biodisponibilidad del 18β-AG al ser absorbida en el sitio o zona de aplicación, por efecto de la composición de excipientes (formula) que en combinaciones

forman nanoemulsiones con polaridad, estructura y tamaño de partícula de 1 a 500 nm, preferentemente de 1 a 50 nm, y de 500 a 1000 nm, preferentemente de 600 a 700 nm, capaz de potencializar la permeabilidad, y en consecuencia la biodisponibilidad del fármaco sobre el tejido de aplicación.

Dicha nanoemulsión puede ser gelificada para mejorar la retención en la zona de aplicación para el tratamiento de ciertos padecimientos, por ejemplo, las infecciones cutáneas por VPH, lesiones intraepiteliales cervicales y el cáncer cervicouterino. Las formas farmacéuticas de la presente invención exhiben valores específicos de permeabilidad, coeficiente de difusión, polidispersión específicas que ayudan a la invención a proporcionar sus ventajas técnicas.

Las formulaciones y formas farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son soluciones, micro- y nanoemulsiones que tienen una alta concentración de 18β-AG, y un tamaño de partícula reducido, en comparación con otras formulaciones reportadas anteriormente. Aunque se han reportado formulaciones con concentraciones iguales o superiores del principio activo o micro y nanoemulsiones con 18β-AG, la formulación de la presente invención combina una alta concentración del compuesto activo, una micro- o nano emulsión y excipientes que permiten una mayor permeación. La combinación de estas propiedades otorga a la presente

formulación propiedades superiores de permeación y estabilidad, no reportadas previamente en la literatura.

La presente invención se refiere a nanoemulsiones con una alta permeación por el efecto combinado del tamaño reducido de partícula, la alta concentración del compuesto activo, la composición estructural de sus micelas polares y el efecto emoliente de sus excipientes, adaptadas principalmente para su aplicación óptima en el tracto vaginal-cervical, para el tratamiento de diversos padecimientos relacionados con infecciones, lesiones preneoplásicas y cáncer cervicouterino.

La presente invención corresponde a formulaciones, preferiblemente soluciones, micro y nanoemulsiones que contienen 18β-AG como principio activo, elementos solubilizantes como derivados del dietilenglicol, derivados del propilenglicol o polietilenglicol, elementos surfactantes como polioxiglicéridos del ácido cáprico, láurico, linoleico, oleico, o de triglicéridos de ácido esteárico, uno o más alcoholes grasos etoxilados como cosurfactantes y un vehículo oleaginoso emoliente como isopropil miristato.

Estas formulaciones tienen la propiedad de tener una alta permeación debido a su tamaño reducido de partícula, a la composición estructural y la polaridad de las micelas formadas en la nanoemulsión, al modificar la estructura del tejido cutáneo en su zona de aplicación. Dichas formulaciones

contienen el fármaco en concentraciones que van del 0.001% al 30% en peso (0.0001 a 0.3 g/mL). Entre las distintas composiciones y formas farmacéuticas que se derivan de dichas formulaciones, se incluyen aerosoles, nebulizadores, soluciones, soluciones estériles, espumas, liofilizados, sólidos, capsulas de gelatina blanda, implantes, parches transdérmicos y geles. De estas formas farmacéuticas, los geles en especial están pensados para su uso y aplicación para el tratamiento de enfermedades relacionadas a las infecciones virales como las del virus del papiloma humano y por ende al cáncer. Adicionalmente los geles están diseñados para incrementar su absorción en la zona de aplicación por efecto mucoadhesivo en viscosidades que comprenden de 1500 a 2500 cP (centipoise) y presentar un pH de 3.8 a 6.5, preferentemente de 4.5 a 5.5, ya que, sus propiedades como alta permeación y viscosidad potencializan la biodisponibilidad del fármaco, ayudando con ello a que el fármaco tenga un mejor efecto y en menor tiempo.

El AG y el 18β-AG son principios activos diferentes, pero se han sugerido como equivalentes por algunos autores. En este sentido se realizó un ensayo de inhibición de la supervivencia celular de diferentes líneas celulares al estar expuestas por 24 horas a uno de los dos fármacos **Figura 1**. En el experimento se probaron cuatro líneas celulares: HeLa que

son líneas celulares representativas de cáncer e infección por VPH-18, SiHa que son células representativas de cáncer cérvicouterino con la infección VPH-16, C-33A que son células representativas de carcinoma de cérvix negativas al VPH y HaCaT que son células negativas al cáncer y a la infección. El experimento consistió en exponer células de las diferentes líneas celulares a distintas concentraciones de ambos fármacos por 24 horas (10-100 µM) yendo de 10 en 10 µM. Los resultados demuestran que, para las líneas celulares representativas de infección por VPH y cáncer cervicouterino, el 18β-A tiene en su conjunto un mayor efecto terapéutico en comparación al efecto del AG, que muestra un efecto menor en la inhibición de la supervivencia celular (líneas celulares HeLa y C-33A) o ningún efecto como en el caso de la línea celular SiHa. Estos resultados en su conjunto sugieren que para el tratamiento de padecimientos como la infecciónón por VPH y el cáncer cervicouterino el 18β-AG tiene un mayor efecto que el AG al disminuir la supervivencia de las líneas celulares cancerigenas.

Esta diferencia en el desempeño de los fármacos puede explicarse por la diferencia en sus mecanismos de acción. En la **Figura 2** se muestran los resultados de un ensayo cometa o ensayo de electroforesis de célula única. El ensayo cometa es un experimento que permite ver si el fármaco tiene un efecto

citotóxico relacionado con la fragmentación del ADN de las células. Esta diferencia se visualiza por el tamaño de las "colas" de los "cometas", que es el ADN fragmentado proveniente de las células bajo estudio. Como se puede ver en la **Figura 2A**, el 18β-AG genera una fragmentación considerable del ADN en células cancerígenas (HeLa) tratadas con el fármaco. En comparación, las células sanas (HaCaT) presentan una fragmentación muchísimo menor al ser tratadas con el fármaco. Por el otro lado las células, tanto cancerígenas (HeLa) como sanas (HaCaT), tratadas con AG no presentan dicha fragmentación. En la **Figura 2B** se muestran las gráficas y análisis estadísticos realizados a los resultados de dicha prueba. Se realizó un análisis con una prueba de Wilcoxon para verificar si las medias en el porcentaje de ADN en las colas de los cometas de las distintas líneas celulares difieren. Para el caso de la línea celular control, HaCaT, el valor de $P > 0.05$ indica que no hay diferencia entre los distintos tratamientos en esa línea celular. Para el caso de la línea celular HeLa el valor de $P < 0.05$ indica diferencia en el efecto de los tratamientos aplicados a esa línea celular, especialmente el 18β-AG. En conclusión, estos experimentos dejan claro que el 18β-AG tiene un efecto citotóxico selectivo en células cancerígenas, provocando la fragmentación del ADN por la muerte celular programada o apoptosis inducida por 18β; a diferencia

del AG donde no se presentó dicho efecto en las células tratadas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el porcentaje de supervivencia de células de cáncer e infección por VPH ante la exposición a los fármacos AG y el 18β-AG. En ella se observa que el 18β-AG tiene un efecto citotóxico más amplio y potente en comparación al AG.

La figura 2 describe datos representativos del porcentaje del tail-DNA. (A) Microfotografías del ensayo cometa alcalino mostrando imágenes representativas de las líneas celulares de CC y su control negativo con sus tratamientos de 18B y AG de HeLa (cáncer de cérvix HPV 18) y HaCaT (queratinocito inmortalizado HPV negativo) (B) Grafica de datos del ensayo cometa del porcentaje del Tail-DNA $**P<0.43$ para HaCaT y $P<2^{-16}$. Se observan comentas más grandes al tratamiento con 18B.

La figura 3 muestra el ensayo de permeabilidad *in vitro;* (A) Dibujo esquemático del experimento, se muestra el montaje de la membrana de simulación de tejido de piel, para comprobar la permeación y el efecto biológico de las distintas formulaciones. El sistema se compone de un pozo de cultivo, con células en monocapa $1x10^6$. Dentro del pozo se colocan de

8-10 mL de medio de cultivo y un dispositivo que tiene la capacidad de flotar sobre el medio; en la parte interna del dispositivo cuenta con una membraba Millipore Strat-M® con un tamaño de poro ideado para simular las condiciones de la piel y se encuentra herméticamente cerrado. Dentro del dispositivo de flotación y ya colocada la membrana, se coloca la forma farmacéutica a probar. Si la forma farmacéutica permea la membrana, se observará un mayor efecto en la supervivencia celular.

La figura 4 describe la citometría de flujo de los ensayos de permeabilidad *in vitro*; (A-C) Resultados muestran los datos de supervivencia y muerte celular de los experimentos realizados con el montaje de la figura 3. La cuantificación de células viables y no viables se determinó por citometría de flujo mediante análisis de células vivas y muertas Live/Dead Cell Double Staining Kit (Sigma). Los resultados muestran que los cultivos celulares de cáncer de cérvix HeLa expuestos a la emulsión y la nanoemulsión tienen una mayor proporción de células no viables (41-94% de células no viables, respectivamente), en comparación a una solución (13%). Por otro lado, las células controles (HaCaT) no presentan una disminución significativa en la proporción de células viables al ser expuestas a cualquiera de estas tres formulaciones (0.1-0.3% de células no viables). En su conjunto se demuestra que,

a mayor permeabilidad del compuesto activo, mejor es el efecto citotóxico en células cancerígenas.

La figura 5 muestra la gráfica de las medias del tamaño de partícula de las diferentes formulaciones. Se observan las medias de las diferentes formulaciones con sus diferentes tamaños de partícula distintos en un amplio rango de tamaños. Emulsión: 2500 nm; Nanoemulsión 1: 789.45 nm; Nanoemulsión 2: 678.13 nm; Nanoemulsión 3: 7.08 nm; Nanoemulsión 4 nm. Los tamaños dependen de la proporción de los excipientes utilizados en la formulación, siendo el tamaño no dependiente de manera lineal de algún componente en específico.

La figura 6 muestra la gráfica de las medias de los radios hidrodinámicos de las partículas de las distintas formulaciones de la invención. Emulsión: 2850 nm; Nanoemulsión 1: 820 nm; Nanoemulsión 2: 750 nm; Nanoemulsión 3: 21.16 nm; Nanoemulsión 26.94 nm.

La figura 7 describe la gráfica de la permeabilidad obtenida de las distintas formulaciones de la invención.

La figura 8 muestra una regresión lineal entre el tamaño de partícula y la permeación del 18β-AG de la formulación. El valor cercano a 0 de R^2(r cuadrada) y el valor de P>0.05 (p-valor) indican que no hay una correlación entre el tamaño de partícula y la permeación del 18β-AG. Ello indica

que, para una formulación dada, todos sus componentes (tamaño de partícula, tipo y proporción de excipientes, concentración del principio activo y efecto emoliente de los excipientes) intervienen en lograr una mayor permeabilidad.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una nanoemulsión que potencializa la biodisponibilidad del 18β-AG, al ser absorbida en el sitio o zona de aplicación a tratar por efecto de su reducido tamaño de partícula de 1 a 100 nm y de 500 a 1000 nm, preferiblemente a una concentración del 0.01% al 30% y un tamaño de partícula o micelas de 1 a 500 nanómetros, preferiblemente de 1 a 50 nm, preferiblemente de 1 a 20 nm en una modalidad, y de 500 a 1000 nanómetros, preferiblemente de 600 a 700 nm en otra modalidad. La formulación está compuesta por el principio activo ácido glicirretínico (18β-AG), un elemento solubilizante como derivados del dietilenglicol, derivados del propilenglicol o derivados de los polietilenglicol, un elemento surfactante como un polioxiglicérido, por ejemplo, polioxiglicérido del ácido cáprico, láurico, linoleico, oleico, o de triglicéridos de ácido esteárico, un cosurfactante como uno o más alcoholes grasos etoxilados, por ejemplo, alcoholes con la estructura R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH donde R es una cadena alquílica con tamaño de 12

a 18 carbonos y n representa los moles de óxido de etileno, que puede tener un valor de 2 a 25 y un vehículo oleaginoso emoliente, por ejemplo, isopropil miristato. La combinación de los distintos excipientes con el fármaco genera micelas con una composición estructural polar que mejoran la biodisponibilidad del principio activo al contribuir con la permeación de la fórmula. Asimismo, los excipientes utilizados en la formulación ayudan de manera sinérgica al incremento de la permeación, debido al efecto emoliente de algunos de estos.

Las formas farmacéuticas de acuerdo con la presente invención presentan un valor de permeación de 0.6 a 47.8 $\mu g/h/cm^2$, en donde la composición tiene un coeficiente de difusión de 0.003 a 1.5 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 2 a 50.

Dicha formulación puede ser utilizada en forma líquida y empacada en diversas presentaciones para el tratamiento de los distintos padecimientos para los que se sabe el 18β-AG tiene un efecto terapéutico. Asimismo, la nano-emulsión puede ser gelificada, con ayuda de ciertos excipientes para su aplicación conveniente en el tratamiento de ciertos padecimientos como lesiones, infecciones virales y el tratamiento de ciertos cánceres.

La presente invención provee una serie de formulaciones que contienen 18β-AG, en combinación con otros excipientes adecuados para cada formulación farmacéutica. En

resumen, la formulación se compone de derivados del dietilen glicol, polioxiglicéridos, un vehículo oleaginoso, alcoholes grasos y sus derivados, aceite de ricino y dióxido de silicio, así como conservadores y estabilizadores.

Las formulaciones atienden la necesidad de formulaciones cuyo ingrediente activo es 18β-AG en concentraciones del 0.001 al 30% en peso con una alta permeación del ingrediente activo. Las distintas formulaciones están pensadas para su administración por varias rutas, como oral, inhalada, inyectable y tópica.

En una modalidad de la invención la formulación es una **solución** de 18β-AG, que se compone de un elemento solubilizante, por ejemplo, derivados del dietilenglicol, propilenglicol o poietilenglicoles, preferentemente 2-(2-etoxietoxi)-etanol, un elemento estabilizador, por ejemplo, polioxiglicéridos del ácido cáprico, láurico, linoleico, oleico o de triglicéridos de ácido esteárico, y un vehículo oleaginoso emoliente, por ejemplo, isopropil miristato. En otra modalidad además de los componentes anteriores, la mezcla puede contener uno o más alcoholes grasos etoxilados o sus derivados, así como aceite de ricino o un derivado de este, como polioxietilenos del aceite de ricino como elementos estabilizadores.

En una modalidad preferida el método de preparación

de la **solución** consiste en mezclar los componentes de la fórmula y calentar la mezcla anterior hasta solubilizar el principio activo, concluida la disolución del principio activo enfriar a temperatura ambiente con agitación constante. Los componentes de la mezcla se encuentran en un porcentaje p/p (porcentaje en peso) del 0.001 al 30%, preferentemente del 0.001 al 5% para el 18β-AG, 40 al 60% para el derivado del dietilen glicol, 1 al 15% para el polioxiglicérido, 10 al 20% para el vehículo oleaginoso o emoliente, del 0 al 15% para el alcohol graso etoxilado y del 0 al 20% para el aceite de ricino o sus derivados.

En otra modalidad de la invención la formulación es una **emulsión**, donde la emulsión se compone de un derivado del dietilen glicol, preferentemente 2-(2-etoxietoxi)-etanol, un vehículo oleaginoso emoliente, por ejemplo, isopropil miristato, aceite de ricino o un derivado de este y agua destilada. En una modalidad preferida el método de preparación es una emulsión por inversión en fase reversa. En dicho método se mezclan los componentes en porcentajes p/p del 40% al 60% para el derivado del dietilen glicol, 10% al 20% para el vehículo oleaginoso, 0% al 20% para el aceite de ricino o sus derivados, y 0% al 15% para el alcohol graso etoxilado. A estos componentes se le adiciona el principio activo 18B en una concentración p/p del 0.001 al 30%, preferentemente del 0.001

al 5%. La mezcla se mantiene en agitación y se calienta hasta disolver el principio activo. Una vez disuelto el principio activo, se adiciona agua destilada en la cantidad necesaria, que va del 5 al 50% en peso de la mezcla total.

En otra modalidad de la invención la formulación es una **nano-emulsión**, que se compone de un derivado del dietilen glicol, preferentemente 2-(2-etoxietoxi)-etanol, un polioxiglicérido del ácido cáprico, láurico, linoleico, oleico, o de triglicéridos de ácido esteárico, un vehículo oleaginoso o emoliente, por ejemplo, isopropil miristato y agua destilada. En una modalidad preferida el método de preparación es una emulsión por inversión en fase reversa. En dicho método se mezclan los componentes en porcentajes p/p del 40% al 60% para el derivado del dietilen glicol, 10% al 20% para el vehículo oleaginoso y 0 al 15% para el alcohol graso etoxilado. A estos componentes se le adiciona el principio activo 18β-AG en una concentración p/p del 0.001 al 30%, preferentemente del 0.001 al 5%. La mezcla se mantiene en agitación y se calienta hasta disolver el principio activo. Una vez disuelto el principio activo, se adiciona agua destilada en la cantidad necesaria, que va del 5 al 50% en peso de la mezcla total.

Con el proceso descrito anteriormente se obtiene una nano-emulsión, con tamaños de partícula variables según los excipientes utilizados. La permeabilidad incrementada de las

distintas formulaciones se logra gracias a la acción combinada de los distintos componentes de la formulación. Específicamente son tres elementos los que otorgan la permeabilidad incrementada:

- El elemento solubilizante, en este caso el derivado del dietilen glicol, referentemente 2-(2-etoxietoxi)-etanol ayuda a lograr una alta solubilidad del compuesto activo 18β-AG y por ende incrementa la concentración de este en la formulación y en consecuencia una mayor permeación de este.
- Los elementos surfactantes y cosurfactantes, en este caso los alcoholes grasos y sus derivados, por ejemplo alcoholes con la estructura general $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$ donde R es una cadena alquílica con tamaño de 12 a 18 carbonos y n representa los moles de óxido de etileno, que puede tener un valor de 2 a 25, que ayudan a otorgar a las partículas su estructura micelar con polaridad. La naturaleza anfipática de estos compuestos ayuda a que, por un lado, la parte lipofílica de los alcoholes grasos encapsulen al diluyente, en este caso el derivado del dietilen glicol, por ejemplo el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, con el compuesto activo en las micelas, y por el otro, la parte hidrofílica polar de los alcoholes ayuda a la dispersión de las partículas o micelas en las fases acuosas y oleosa del medio, impidiendo su aglomeración por la repulsión electrostática entre partículas, otorgando con ello

estabilidad a la fórmula. Además, la naturaleza polar de las partículas ayuda a que las partículas atraviesen las distintas capas celulares que conforman el tejido en la zona de aplicación.

- El elemento emoliente de la fase oleosa, en este caso el vehículo oleaginoso, por ejemplo, el isopropil miristato. Su actividad como emoliente ayuda a la mejora de la permeabilidad de las sustancias a través de la piel, pues tiene el efecto de suavizar las capar externas de la piel, por efecto de la humectación de estas.

En una modalidad preferida los tamaños de partícula de la micro-emulsión y la nano-emulsión están en el rango de los 1 nm a los 500 nm (nm nanómetros), preferentemente de 1 a 50 nm, preferentemente de 1 a 20 nm. En otra modalidad preferida los tamaños de partícula están en el rango de los 500 a los 1000 nm, preferentemente de 500 a 700 nm, preferentemente de 500 a 600 nm.

La presente invención también proporciona un método para la preparación de formulaciones de soluciones, emulsiones y nanoemulsiones gelificadas, en donde el método comprende las etapas de:

- Se prepara una solución, una emulsión o una nano-emulsión según se describe en los pasos anteriores.
- Se adicionan elementos y/o excipientes

gelificantes.

- La mezcla se someta a agitación. Se adicionan elementos conservadores y estabilizadores
- Se ajusta el pH según la aplicación farmacológica, siendo este ajuste preferentemente de 4 a 5 para su aplicación en vagina.

En una modalidad preferida los excipientes y elementos gelificantes son: derivados de la celulosa, por ejemplo, hidroxipropil celulosa (HPC), hidroxietil celulosa (HC) o hidroxipropil metil celulosa (HPmC), polímeros de ácido acrílico o un miembro de la familia de los poloxámeros.

En una modalidad preferida los agentes conservadores y estabilizadores pueden ser: Butilhidroxitolueno (BHT) (antioxidantes), butilhidroxianisol, L-cisteína, propilparabeno, metilparabeno, cloruro de benzalconio, benzoato de sodio y ácido benzoico.

En ciertas modalidades preferibles, pero no limitantes, los diversos componentes de las fórmulas anteriormente mencionadas son de manera no limitativa:

Derivado del dietilenglicol: 2-(2-etoxietoxi)-etanol

Polioxiglicéridos: polioxiglicérido del ácido cáprico, láurico, linoleico, oleico, de triglicéridos de ácido esteárico.

Vehículo oleaginoso o emoliente: Isopropil

miristato.

Alcoholes grasos y sus derivados: alcoholes con la estructura general $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$ donde R es una cadena alquílica con tamaño de 12 a 18 carbonos y n representa los moles de óxido de etileno, que puede tener un valor de 2 a 25

Agente anti cristalino: Polivinilpirrolidona en sus diferentes grados de polimerización y ciclodextrinas.

Los siguientes son ejemplos representativos, pero no limitantes de las formulaciones descritas anteriormente:

Ejemplo 1:

En una modalidad preferida la invención refiere a una solución con la composición:

- 18β-AG: 5.5%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 94.5%

Que se prepara disolviendo el compuesto activo, 18β, en el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, la mezcla se calienta en un rango de 50 a 80 grados Celsius, preferentemente de 60 a 70 grados Celsius y se somete a agitación, hasta disolver el principio activo. La solución resultante tiene una permeación de 0.6 µg/h/cm2.

Ejemplo 2:

En otra modalidad preferida la invención refiere a

una **emulsión**, con una composición de:

- 18β-AG: 4.4%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 71.6%
- Isopropil miristato: 12%
- Agua destilada: 12%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol y el isopropil miristato, la mezcla se calienta en un rango de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La emulsión resultante tiene una permeación de 1.8 µg/h/cm2, un tamaño de partícula de 2500 nm, un radio hidrodinámico de 2850 nm, un coeficiente de difusión de 1.26 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 39.8.

Ejemplo 3:

En otra modalidad preferida la invención refiere a una **nano-emulsión**, con una composición de:

- 18β-AG: 5%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 53%
- $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$, donde R es un alquilo de 12 carbonos y n es igual a 9: 2.5%

- Aceite de ricino hidrogenado: 6.5%
- Isopropil miristato: 15%
- Agua destilada: 18%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el alcohol graso etoxilado de 12 carbonos, el Aceite de Ricino hidrogenado y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 2.8 $\mu g/h/cm^2$, un tamaño de partícula de 789 nm, un radio hidrodinámico de 820 nm, un coeficiente de difusión de 0.0038 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 26.

Ejemplo 4:

En otra modalidad preferida la invención refiere a una **nano-emulsión**, con una composición de:

- 18β-AG: 4.5%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 54%
- $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$, donde R es un alquilo de 12 carbonos y n es igual a 9: 3.1%

- Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido: 14.4%
- Isopropil miristato: 12%
- Agua destilada: 12%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el alcohol graso etoxilado de 12 carbonos, el Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 8 µg/h/cm2, un tamaño de partícula de 678.13 nm, un radio hidrodinámico de 750 nm, un coeficiente de difusión de 0.0029 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 2.3.

Ejemplo 5:

En otra modalidad preferida la invención refiere a una nano-emulsión1, con una composición de:

- 18β-AG: 3.9%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 44%
- R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH, donde R es un alquilo de 12

carbonos y n es igual a 9: 3%

- Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido: 13%
- R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH, donde R es un alquilo de 18 carbonos y n es igual a 5: 10.6%
- Isopropil miristato: 18%
- Agua destilada: 7.5%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el alcohol graso etoxilado de 12 carbonos, el alcohol graso etoxilado de 18 carbonos, el Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 47.85 µg/h/cm2, un tamaño de partícula de 7.08 nm, un radio hidrodinámico de 21.16 nm, un coeficiente de difusión de 0.067 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 47.9, el mismo ejemplo muestreado solo el tiempo 24 horas, sin emplear agitación en la celda de Franz y cuantificando través de HPLC acoplado a UV (C18/5µm/25cm, λ:250nm,Acetato de sodio-Tetrahidrofurano pH 4.8) obtuvo un recobro de 276.07 ± 9.08 µg/mL (2.62 ± 0.09 mg/cm2) equivalente a 5.75 ± 0.19

µg/h/cm2,lo que denota que el uso de sistemas de dinámicos (agitación) en el medio receptor de la celda de Franz favorecer la difusión del fármaco a través de las membranas en evaluación, mismos sistemas empleados por varios autores tales S. Li *et. al.* Medio: PBS 7.4 Velocidad: 280 rpm (Skin Pharmacol Physiol 2012;25:257–268), PUGLIA C. et al. Medio: Etanol-Agua (50:50) Velocidad: 500 rpm (Drug delivery, 2010, vol. 17, no 3, p. 123-129.). Como reto fisicoquímico a la nano-emulsión generada, esta fue sometida a 15 ciclos de estrés que comprendieron un calentamiento de 50°C/22.5 horas con periodos de centrifugación a 4000rpm/90min/4°C por un periodo de 15 días, no obteniendo cambios significativos con respecto al tamaño de partícula de la nano-emulsión generada.

Ejemplo 6:

En otra modalidad preferida la invención refiere a una nano-emulsión, con una composición de:

- 18β-AG: 5%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 55.5%
- Aceite de ricino hidrogenado: 4%
- R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH, donde R es un alquilo de 18 carbonos y n es igual a 5: 15.5%
- Isopropil miristato: 10%
- Agua destilada: 10%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el aceite de ricino hidrogenado, el alcohol graso etoxilado de 18 carbonos, el caprilocaproil Polioxil-8 glicérido y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 8 µg/h/cm2, un tamaño de partícula de 7.54 nm, un radio hidrodinámico de 26.94 nm, un coeficiente de difusión de 0.176 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 37.14.

Ejemplo 7:

En otra modalidad preferida la invención refiere a una nano-emulsión, con una composición de:

- 18β-AG: 4.0%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 56%
- $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$, donde R es un alquilo de 12 carbonos y n es igual a 9: 3%
- $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$, donde R es un alquilo de 18 carbonos y n es igual a 5: 11.0%

- Isopropil miristato: 18%
- Agua destilada: 8.0 %

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el alcohol graso etoxilado de 12 carbonos, el alcohol graso etoxilado de 18 carbonos y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 2.36 ±0.75 µg/h/cm2, un tamaño de partícula de 10.35 nm, un radio hidrodinámico de 37.7 nm, un coeficiente de difusión de 12.98 $\mu m^2/s$ y una polidispersión de 26.8, el anterior ejemplo denota que la exclusión del Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido con respecto al ejemplo 5 reduce la permeación del fármaco significativamente (2.36 vs 47.85 µg/h/cm2), por efecto de cambio en la polaridad en la Nano-emulsión formada puesto que las partículas presentaron un tamaño semejantes entre ambos sistemas (10.5 vs 7.08 nm).

Ejemplo 8:

En otra modalidad preferida la invención refiere a

una nano-emulsión, con una composición de:

- 18β-AG: 4.3%
- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 47.1%
- Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido: 13%
- R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH, donde R es un alquilo de 18 carbonos y n es igual a 5: 10.1%
- Isopropil miristato: 18%
- Agua destilada: 7.5%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el alcohol graso etoxilado de 18 carbonos, el Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 4.06 µg/h/cm2.

Ejemplo 9:

En otra modalidad preferida la invención refiere a una nano-emulsión, con una composición de:

- 18β-AG: 4.0%

- 2-(2-etoxietoxi)-etanol: 57%
- R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH, donde R es un alquilo de 12 carbonos y n es igual a 9: 3%
- Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido: 13%
- R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH, donde R es un alquilo de 18 carbonos y n es igual a 5: 10.5%
- Isopropil miristato: 5%
- Agua destilada: 7.5%

El método de preparación consiste en mezclar el 2-(2-etoxietoxi)-etanol, el alcohol graso etoxilado de 12 carbonos, el alcohol graso etoxilado de 18 carbonos, el Caprilocaproil Polioxil-8 glicérido y el isopropil miristato. La mezcla es calentada a una temperatura de 50 a 80 grados Celsius, preferiblemente de 60 a 70 grados Celsius. Alcanzadas la temperatura deseada la mezcla se somete a agitación y se le agrega el 18β-AG. Una vez disuelto el principio activo a la mezcla se le añade el agua destilada, se detiene la agitación y se deja enfriar a temperatura ambiente. La nano-emulsión resultante tiene una permeabilidad de 1.98 µg/h/cm2, esto refiere que isopropil miristato en proporciones menores a las enunciadas en el ejemplo 5 decrece la permeación del fármaco en el sistema formado, por lo tanto, se concluye que existe una dependencia y sinergismo entre los insumos empleados y sus proporciones dentro de la nano-emulsión de ácido 18β-AG.

En este sentido, la **Figura 5** muestra los distintos tamaños de partícula de las distintas formulaciones ejemplificadas anteriormente. El tamaño fue determinado mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, con un equipo litesizer, previamente verificado con una suspensión nanopartículas de látex de poliestireno de 220 nm. Según la composición de la formulación se obtienen tamaños de partícula distintos que van, para los ejemplos específicos, de los 7 nm en el caso de las nanoemulsiones a los 2500 nm para el caso de la emulsión. **La Figura 6** muestra los radios hidrodinámicos de las partículas de las distintas formulaciones. Dicha cuantificación también fue obtenida con el equipo litesizer.

La **figura 7** muestra los resultados del análisis de permeabilidad de las distintas formulaciones. El ensayo se realizó mediante un estudio de permeabilidad de membranas sintéticas en una celda de Franz, donde se cuantifico la cantidad de principio activo que traspasaba una membrana compuesta de dos capas de polietersulfona y una poliolefina de comercializada bajo la marca Millipore con polaridad y tamaño de poro similar al de la piel humana y como medio receptor solución isotónica de fosfatos pH 7.4 (PBS:7.4). Como se observa, por lo general entre menor tamaño de partícula mejor es la permeabilidad de la formulación. De igual modo contrasta

que el tamaño de partícula y la composición específica de la micela o partículas afecta la permeabilidad (la polaridad de las estructuras micelares puede favorecer o reducir la permeabilidad del sistema formado independientemente del tamaño de partícula de las estructuras producidas).

Los resultados de las caracterizaciones anteriormente mencionadas denotan la importancia del tamaño de partícula en el incremento de la permeación del fármaco. Sin embargo, en la **figura 8** se demuestra que, al hacer una correlación entre los tamaños de partícula de las distintas formulaciones y la permeabilidad de estas, el tamaño de partícula no es el único factor que determina la permeabilidad de la fórmula. Esto se explica por el efecto sinérgico entre el tamaño disminuido de partícula, el efecto de emoliente de uno de los excipientes utilizados en la formulación y la composición estructural de las micelas de la formulación. El efecto emoliente de los excipientes cumple con la función de modificar la estructura de la piel, cambiando la rigidez del tejido y facilitando con ello la permeabilidad de las partículas de la nano-emulsión. Los excipientes que actúan como surfactantes y cosurfactante otorgan a la estructura de las micelas de la nano-emulsión una polaridad, lo cual es otro factor que incrementa la permeación de la fórmula y ayuda a su estabilización, impidiendo la aglomeración de las partículas

por la repulsión electrostática entre estas.

En la tabla 1 se muestra la comparación entre distintas propiedades de las formulaciones anteriormente descritas y la nano-emulsión de la presente invención. En la tabla se describen las propiedades de la mejor formulación reportada en cada caso. Como se puede apreciar la presente formulación tiene tamaños de partícula significativamente menores en comparación a los resultados previamente reportados. Asimismo, la permeación del fármaco es significativamente mayor.

Tabla 1

Formulación	**Tipo**	**Concentración %18β**	**Tamaño de partícula (nm)**	**Permeación** (µg/h/cm2)	**Notas**
Invención	Nano-emulsión	1.0 - 5.0	7 ± 2.1	4.52 ± 0.15	
Invención	Nano-emulsión gelificada	1.0 - 4.0	10.14 ± 2.5	1.66 ± 0.15	
Carmelo Puglia, et al	Nano-emulsión	0.5	210 ± 30.1	0.60 ± 0.08	Inestable a temperatura ambiente.
S.Li et al	Liposomas	0.3 - 0.9	20 a 170	0.46	
Moumita Mishra et	Nano-emulsión	No reportada	58 a 183	0.387	

A partir de las soluciones, emulsiones y nanoemulsiones presentada en la presente invención se derivan las siguientes formas farmacéuticas:

En una modalidad la forma farmacéutica es un **aerosol.** Para su elaboración una nano-emulsión de 18β-AG con un tamaño de partícula de 1 – 50 µm es dispersada en un gas farmacéuticamente aceptable como hidrocarburos hidroflourocarbonados tales como clorofluorocarburtos, hrofluorocarburos en específico tetrafluoroetano, gases licuados o gases inertes tales como nitrógeno dióxido de carbono, óxido nitroso o aire comprimido, en dosis que comprenden 4 µg a 20 mg por dosis aplicada.

En una modalidad la forma farmacéutica es un **agente nebulizador**, para su elaboración a una solución de 18β-AG disuelta en un 25 – 80% de la mezcla final, se le agrega un Surfactante 5 – 30%, cosurfactante 2 – 20%, tensoactivo 5 – 30% y un vehículo oleoso (5 – 30%) conservador 0.5 – 2%,

antioxidante 0.1 - 1.0 % tales como dietilenglicol monoetileter, derivados de polisorbato, Polioxigliceridos o Derivados de ácido mirístico, etanol para ser empleada en terapias de nebulización, al dispersar el producto en soluciones isotónicas o en agua previo al inicio del tratamiento y obtenido tamaños de partícula que comprenden desde 8 nm a 1 µm.

En otra modalidad la forma farmacéutica es una **solución estéril.** Esta se prepara con ácido glicirretínico(18β)disuelta en un solvente (25 – 90%), surfactante 5 – 50% y un diluente, tales como dietilenglicol monoetileter, derivados etoxilados de polietilenglicol con cadenas alquiladas de C10 a C 20, Polioxigliceridos, aceite de ricino y sus derivados, agua, etanol, en dosis de ácido glicirretínico(18β) que pueden comprender desde 0,5 – 15 %, la solución obtenida es filtrada a través de una membrana de 0.22 µm en condicione asépticas para ser proceder a esterilización terminal por calor húmedo.

En otra modalidad la forma farmacéutica es una **espuma.** La formulación se compone de enoxolona disuelta un solvente (25 – 90%), Surfactante 5 - 50%, tensoactivo 5 – 30%, conservador 0.5 – 2%, antioxidante 0.1 - 1.0 % y un diluente, tales como dietilenglicol monoetileter, derivados etoxilados de polietilenglicol con cadenas alquiladas de C10 a

C 20, Polioxigliceridos , Derivados de ácido mirístico, aceite de ricino y sus derivados, agua, etanol, en dosis que pueden comprender desde 0,5 – 15 %, la descripción anterior será envasada con un gas inerte como propelente tales gases comprenden pero no están limitados a aire comprimido, nitrógeno y dióxido de carbono.

En otra modalidad la formulación es un **Liofilizado.** Enoxolona disuelta un solvente (25 – 90%), Surfactante 5 - 50%, tensoactivo 5 – 30%, conservador 0.5 – 2%, antioxidante 0.1 - 1.0 %, crioprotectores 10 – 40 % un diluente líquido y sólido, tales como dietilenglicol monoetileter, derivados etoxilados de polietilenglicol con cadenas alquiladas de C10 a C 20, Polioxigliceridos , Derivados de ácido mirístico, aceite de ricino y sus derivados, agua, etanol, sorbitol, manitol o lactosa, en dosis de Enoxolona que pueden comprender desde 0,5 – 15 %, para ser sometidas a liofilización y obtener un producto bajo en agua.

En otra modalidad la formulación es un **sólido.** Para su fabricación enoxolona mezclada en excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden y no están limitados a Diluente 30 – 90%, lubricante 0.5 – 5.0%, desintegrante 0.5 – 5.0%, antiadherente 0.5 – 5.0%, tensoactivos 0.5 – 10% y aglutinantes 1.0 – 20.0%; como diluentes podemos mencionar pero no limitar a celulosa

microcristalina, carbohidratos y sus derivados (lactosa, manitol, sorbitol, etc.), derivados coprocesados de celulosa y sus combinaciones, Lubricantes: Benzoato de sodio Ácido esteárico y sus derivados, desintegrante: croscarmelosa de sodio, almidón de maíz, crospovidone, etc., Antiadherente: talco, dióxido de silicio, leucina, etc. Tensoactivo: lauril sulfato de sodio, polisorbato y sus derivados, docusato de sodio, aglutinante: polivinilpirrolidona, almidón de maíz, derivados de celulosa. La mezcla anterior podrá ser encapsulada en capsulas de gelatina dura o tableteada por compresión.

En otra modalidad la formulación es una **cápsula de gelatina blanda.** Para su preparación enoxolona disuelta un solvente (25 – 90%), Surfactante 5 – 30%, cosurfactante 2 – 20%, tensoactivo 5 – 30% y un vehículo oleoso (5 – 30%) conservador 0.5 – 2%, antioxidante 0.1 - 1.0 %, tales como dietilenglicol monoetileter, derivados etoxilados de polietilenglicol con cadenas alquiladas de C10 a C 20, Polioxigliceridos , aceite de ricino y sus derivados, en dosis que pueden comprender desde 0,5 – 15 %, la descripción anterior podrá ser dosificada en cápsulas de gelatina blanda.

En otra modalidad la formulación es un **implante.** Para su elaboración se utiliza enoxolona dispersa en polímeros termoplásticos comprendiendo, pero no limitando a derivados de poliuretano o derivados de ácido poliláctico en proporciones

que comprenden 30 – 95 %, la anterior mezcla podrá estar mezclada y no será limitada a un plastificante, mucoadherente para moldeada por fusión para su aplicación final, en dosis de Enoxolona que podrán comprender y no limitar al menos el 20 %.

En otra modalidad, la forma farmacéutica es un **parche transdérmico**. Para su preparación enoxolona disuelta un solvente (25 – 90%), Surfactante 5 – 30%, cosurfactante 2 – 20%, tensoactivo 5 – 30% y un vehículo oleoso (5 – 30%) conservador 0.5 – 2%, antioxidante 0.1 - 1.0 % y un diluente, tales como dietilenglicol monoetileter, derivados etoxilados de polietilenglicol con cadenas alquiladas de C10 a C 20, Polioxigliceridos , Derivados de ácido mirístico, aceite de ricino y sus derivados, agua, etanol, en dosis que pueden comprender desde 0,5 – 20 %, la mezcla anterior es asperjada o atomizada sobre una superficie de poliuretano termoplástico, poliisobutileno o derivados de ácido poliláctico, para formar la película moduladora de liberación la cual será adherida a una capa de polietilen teraftalato que constituirá la película transportadora.