



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 286 951**

② Número de solicitud: 200601399

⑤ Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **26.05.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2007**

Fecha de la concesión: **08.09.2008**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2008

⑦ Titular/es: **INSTITUTO CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.**
Avda. Pío XII, 53
31008 Pamplona, Navarra, ES

⑦ Inventor/es: **Salman, Hesham H.A.;**
Gamazo de la Rasilla, Carlos;
Agüeros Bazo, Maite y
Irache Garreta, Juan Manuel

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Nanopartículas bioadhesivas para la administración de moléculas biológicamente activas.**

⑤ Resumen:

Nanopartículas bioadhesivas para la administración de moléculas biológicamente activas.

La invención se relaciona con nanopartículas para la administración de moléculas biológicamente activas, que comprenden un polímero biodegradable, preferentemente el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA), y tiamina. Estas nanopartículas son fáciles de producir, y dan excelentes características de bioadhesión, tamaño y potencial zeta que las hace adecuadas para la administración de moléculas activas. El procedimiento de obtención de las nanopartículas se realiza por incubación simple durante un corto periodo de tiempo con las nanopartículas preformadas en un medio acuoso. La molécula biológicamente activa puede incorporarse durante el proceso de formación de las nanopartículas por desolvatación o tras la modificación con tiamina. Por vía oral estas nanopartículas desarrollan interacciones bioadhesivas con la mucosa gastrointestinal, incluyendo el tejido linfoide asociado a mucosas (placas de Peyer), lo cual es de utilidad para aumentar la biodisponibilidad oral de diversos fármacos o para inducir respuestas inmunitarias a nivel de mucosas. Así, cuando las nanopartículas contienen un antígeno, en el interior de la matriz de las nanopartículas, la mezcla resultante es capaz de inducir fuertes respuestas inmunitarias frente al antígeno encapsulado. Este efecto estimulante de la respuesta inmunitaria es útil para vacunación e inmunoterapia.

ES 2 286 951 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas bioadhesivas para la administración de moléculas biológicamente activas.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con nanopartículas bioadhesivas, a base de un polímero biodegradable y tiamina, procedimientos para su fabricación, formulaciones que las contienen y sus aplicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

En los últimos años las nanopartículas poliméricas biodegradables han sido propuestas como nuevos sistemas transportadores de fármacos o moléculas biológicamente activas. En el caso de la administración de fármacos a través de mucosas, las características más importantes que ofrecen a la molécula biológicamente activa que incorporan son: (i) protección frente a una posible degradación físico-química y/o enzimática (incremento de su vida media en el organismo); (ii) liberación controlada del fármaco incorporado (efectos sostenidos que permiten disminuir el número de tomas); (iii) interacción/adhesión con la superficie de la mucosa donde tiene lugar la absorción o la acción del fármaco (incremento de su biodisponibilidad); y (iv) en el caso de vacunación, facilitan la presentación del antígeno incorporado a las células presentadoras de antígeno.

La vía oral es la ruta más conveniente y popular para la administración de fármacos. Sin embargo, la biodisponibilidad de una determinada molécula activa depende (i) de las características de la molécula del fármaco y de su forma farmacéutica de administración, y (ii) de las condiciones fisiológicas presentes en el tracto gastro-intestinal, tales como la presencia de enzimas proteolíticas, los movimientos peristálticos y el metabolismo presistémico. El uso de nanopartículas poliméricas puede ser una buena estrategia para superar algunos de estos obstáculos. En principio, estos transportadores poseen una gran superficie específica con lo que su interacción con el soporte biológico (la mucosa gastrointestinal) está facilitada. Igualmente, el control de la liberación del fármaco, permite prolongar en el tiempo el efecto de moléculas con semi-vidas biológicas bajas. Por otra parte, las nanopartículas pueden ser captadas por las células de las placas de Peyer y por los folículos de tejido linfóide. Este fenómeno permite direccionar el fármaco hacia la vía linfática y, en el caso de vacunas, facilitar su presentación antigénica. Sin embargo, las nanopartículas convencionales a base de polímeros biodegradables presentan algunas desventajas importantes con respecto a su uso por vía oral: (i) cierta inestabilidad en los líquidos gastrointestinales, (ii) un bajo grado de absorción intestinal y (iii) un tropismo o adhesión no específica en la mucosa gastrointestinal.

Una posible estrategia para minimizar estos inconvenientes asociados al uso de nanopartículas convencionales, se basa en la utilización de nanopartículas recubiertas con determinados ligandos con especificidad por determinados receptores de la mucosa. Los principales ligandos propuestos para la preparación de estos conjugados nanopartícula-ligando han sido, hasta el momento: (i) anticuerpos; (ii) adhesinas, invasinas u otras proteínas bacterianas; (iii) carbohidratos; (iv) vitamina B₁₂; y lectinas. De entre todos estos tipos de ligandos, las lectinas parecen ser los ligandos más versátiles. Estas moléculas son proteínas o glicoproteínas, de origen no inmunogénico, capaces de reconocer específicamente azúcares localizados en los glicoconjugados.

Diferentes estudios han demostrado la adhesión específica a determinadas zonas del tracto gastrointestinal mediante conjugados entre partículas y lectinas. Así, por ejemplo, se ha visto que la lectina del tomate (*Lycopersicon esculentum*) posee buena afinidad por la mucosa del intestino. Sin embargo, los conjugados con esta lectina tienen muy poca afinidad por las placas de Peyer. Tras la administración en ratas de conjugados se ha observado un retraso del tránsito intestinal y, además, un aumento en su absorción. Igualmente, conjugados a base de ácido poliláctico y las lectinas de *L. esculentum* y *Lotus tetragonolobus* han permitido el aumento de la fracción de partículas adheridas al tracto intestinal.

Otro posible ligando puede ser la tiamina. La tiamina (o vitamina B1) es esencial para el normal desarrollo de las funciones celulares y el crecimiento. Los mamíferos no pueden sintetizar esta vitamina y, por ello, debe ser obtenida vía absorción intestinal desde los alimentos procesados o tras su síntesis por la microflora del intestino grueso. El proceso de absorción de la tiamina es bastante complicado; aunque se ha propuesto un mecanismo basado en la existencia de un receptor (asociado a una bomba de protones) que se encuentra localizado en las membranas basolaterales del jejunum y del íleon. Recientemente, se ha descrito que, en humanos, el transportador de tiamina se expresa a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, aunque de forma mayoritaria en la membrana apical del "borde en cepillo".

El uso de tiamina como ligando de nanopartículas ha sido investigado en los últimos años. Así, se ha descrito que la tiamina puede ser un buen ligando para facilitar la unión o la asociación de las nanopartículas a la barrera hematoencefálica y para interactuar con células de tumor de mama. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene conocimiento del uso de la tiamina como ligando para dirigir nanopartículas destinadas a la administración oral de moléculas biológicamente activas, incluyendo su uso como adyuvantes para vacunación e inmunoterapia.

65 *Uso de adyuvantes en vacunación*

El empleo de adyuvantes particulados en forma de emulsiones, micropartículas, ISCOMS o liposomas ha sido evaluado anteriormente por diversos grupos de investigación [Singh and O'Hagan, Int. J. Parasitology, 33 (2003) 469-478].

La captura de antígenos por “células presentadoras de antígenos” se incrementa cuando estos se asocian con partículas poliméricas o se incluyen dentro de ellas. Poliésteres biodegradables y biocompatibles se emplean en humanos y animales desde hace años como sistemas de liberación controlada de antígenos. En contraposición a los adyuvantes de aluminio, las micro- y nanopartículas son efectivas en la inducción de respuestas inmunitarias celulares y citotóxicas en ratón. En ratón, la inmunización oral con micropartículas induce potentes respuestas inmunitarias a nivel de mucosas y sistémicas frente a los antígenos encapsulados. Esta capacidad es consecuencia de su internalización por células especializadas del tejido linfoide de las mucosas. La inmunización por vía de las mucosas con diferentes sistemas particulados ha demostrado su eficacia frente a distintos patógenos, como *Bordetella pertussis*, *Chlamidia trachomatis*, *Salmonella typhimurium* y *BruceLla sp.*

Uso de adyuvantes en inmunoterapia

El tratamiento de las enfermedades alérgicas puede abordarse fundamentalmente de tres maneras distintas: (i) evitando todo contacto con el alérgeno; (ii) utilizando fármacos antihistamínicos, y (iii) mediante inmunoterapia. Teniendo en cuenta que las dos primeras medidas son, en ocasiones, no aplicables, la inmunoterapia sería el método más adecuado de control.

La inmunoterapia específica con alérgenos ha sido definida como la administración repetida de alérgenos a pacientes con trastornos de salud mediados por IgE, con el propósito de proporcionar protección contra los síntomas alérgicos y las reacciones inflamatorias asociadas con la exposición natural a estos alérgenos.

Esta alternativa de tratamiento está dirigida a potenciar un predominio funcional de la respuesta Th1 respecto a la respuesta Th2, lo cual hará que se inhiba la sintomatología alérgica. Esta modulación hacia Th1 es también aplicable en otros procesos, tales como el control mediante vacunación frente a parásitos intracelulares bacterianos (e.g., *Brucella* o *Salmonella*).

Se han descrito nanopartículas de copolímero de polivinil metil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [WO02/069938], opcionalmente pegiladas [ES2246694], útiles como vehículos de fármacos. Asimismo, se ha descrito el uso de dichas nanopartículas de PVM/MA como sustancias estimuladoras de la respuesta inmune.

No obstante, aunque se ha descrito el empleo de diversos vectores de origen no biológico, por ejemplo, nanopartículas, como adyuvantes en inmunoterapia o en vacunas para la administración de antígenos y/o alérgenos, sigue existiendo la necesidad de proporcionar adyuvantes alternativos a los existentes con el fin de aumentar el arsenal de posibilidades para la elaboración de vacunas y composiciones para inmunoterapia. Ventajosamente, dichos adyuvantes deberían ser útiles para su empleo en inmunización o inmunoterapia por vía oral sin necesidad de tener que utilizar dosis de alérgeno o antígeno muy elevadas. Como es conocido, a pesar de sus potenciales ventajas, la inmunización oral con fines terapéuticos o profilácticos tiene que hacer frente a diferentes obstáculos, ya que la dosis de principio activo inmunogénico o alergénico requerido para un efecto clínico beneficioso es extremadamente grande debido a una pérdida de potencia del inmunógeno. Así, debido a la, en general, poca estabilidad del alérgeno o del antígeno en el tracto gastrointestinal (condiciones de pH y presencia de enzimas hidrolíticas), las dosis deben ser siempre muy superiores (hasta 200 veces) a las utilizadas normalmente por vía subcutánea. Además, la mucosa gastrointestinal actúa como una barrera muy poco permeable a la absorción de estas macromoléculas.

Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar nanopartículas que solucionen los problemas mencionados anteriormente, es decir, que puedan ser administradas por vía oral y sean estables y específicas, que tengan buenas características bioadhesivas para interactuar con las mucosas, que sean capaces de transportar un amplio grupo de moléculas activas y que liberen la molécula activa de forma controlada. Como característica adicional se pretende que dichas nanopartículas actúen como adyuvantes en vacunas e inmunoterapia potenciando la respuesta inmune de antígenos o alérgenos.

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que dichos problemas pueden resolverse mediante unas nanopartículas formadas por un polímero biodegradable y tiamina. En particular, se ha encontrado que nanopartículas que comprenden o consisten en (i) un copolímero de polivinil metil éter (PVM) y anhídrido maleico (MA) y (ii) tiamina, además de ser fáciles de producir, proporcionan excelentes características de bioadhesión y tamaño, lo que las hace adecuadas para la administración a través de diferentes vías de compuestos o moléculas biológicamente activas. Asimismo, se ha podido demostrar que las nanopartículas proporcionadas por esta invención que, opcionalmente, contienen una molécula biológicamente activa, por ejemplo, un alérgeno o un antígeno, tienen la capacidad de estimular o potenciar la respuesta inmunitaria cuando se administran a un sujeto, lo que permite su empleo en inmunoterapia y vacunas.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con nanopartículas que comprenden un polímero biodegradable y tiamina o sus derivados. En una realización particular, dicho polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA). En otra realización particular, la tiamina se encuentra recubriendo total o parcialmente la superficie de las nanopartículas que comprenden dicho polímero biodegradable. En otra realización particular, la relación en peso entre la tiamina y el polímero biodegradable está comprendida entre 1:10 y 1:500, preferentemente, entre 1:10 y 1:100, más preferentemente alrededor de 1:40.

Las nanopartículas proporcionadas por esta invención pueden ser utilizadas para el transporte de moléculas biológicamente activas. En este sentido, dichas nanopartículas pueden incluir una o más moléculas biológicamente activas, cuya naturaleza química puede variar dentro de un amplio abanico de posibilidades, incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos (e.g., ADN, ARN, etc.), nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, etc. Dicha molécula biológicamente activa puede ser un fármaco o compuesto con actividad terapéutica o de diagnóstico, e.g., un agente antitumoral, un protector del sistema nervioso central, un glucocorticoide, etc., un antígeno para vacunación o un alérgeno para inmunoterapia, entre otros. Por tanto, las nanopartículas proporcionadas por esta invención se pueden utilizar en la elaboración de composiciones farmacéuticas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende dichas nanopartículas previamente descritas y una molécula biológicamente activa, en donde dicha molécula biológicamente activa es una molécula capaz de prevenir, aliviar o curar una enfermedad o una molécula con aplicación en diagnóstico, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición es una composición farmacéutica destinada para su administración por vía oral o por vía parenteral. Si se desea, dicha composición farmacéutica puede estar en forma de un liofilizado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna o composición para inmunoterapia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanopartículas proporcionadas por esta invención, previamente descritas, y un antígeno o alérgeno, junto con un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto que comprende, de forma separada, a) un antígeno o un alérgeno; y b) una composición que comprende dichas nanopartículas basadas en un polímero biodegradable y tiamina, como composición potenciadora de la respuesta inmune frente a dicho antígeno o alérgeno, como combinación para su administración simultánea o secuencial a un sujeto, en la inducción o estimulación de una respuesta inmune frente a dicho antígeno o alérgeno en dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de las nanopartículas que comprenden un copolímero biodegradable y tiamina previamente descritas en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmune de Th1, o en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmune de Th2, o en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación equilibrada de las respuestas inmunes de Th1 y Th2.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de las nanopartículas que comprenden un copolímero biodegradable y tiamina previamente descritas que comprende: a) la desolvatación de una solución orgánica que comprende un polímero biodegradable, con una solución hidroalcohólica, para formar las nanopartículas; b) la incubación simultánea de las nanopartículas de polímero biodegradable previamente formadas con tiamina en una solución acuosa; y c) la eliminación de los disolventes orgánicos, con lo que se obtiene una suspensión acuosa de nanopartículas que comprenden un polímero biodegradable y tiamina. Si se desea, dichas nanopartículas pueden estabilizarse mediante el empleo de agentes reticulantes. En una realización particular, la concentración del polímero biodegradable en dichas nanopartículas está comprendida entre 0,001 y 10% p/v y la de la tiamina entre 0,001 y 5% p/v.

Para la obtención de nanopartículas cargadas moléculas biológicamente activas, éstas se pueden incorporar bien en la fase orgánica donde previamente se ha disuelto el polímero biodegradable, antes de su desolvatación, o bien, posteriormente, en la suspensión acuosa de las nanopartículas ya formadas para que se produzca su asociación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una fotografía del resultado de un análisis por microscopía electrónica de barrido para una muestra liofilizada de nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP).

La Figura 2 es un diagrama que muestra la liberación del marcador fluorescente (rodamina B isotiocianato, RBITC) desde las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) y de las nanopartículas control (NP) tras su incubación en medios gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS). Los datos se expresan como media \pm SD (n=3).

La Figura 3 está formada por unos diagramas que muestran la distribución de nanopartículas en el tracto gastrointestinal de animales de laboratorio, tras la administración por vía oral de una dosis de 10 mg de nanopartículas marcadas con RBITC. La Figura 3a es un diagrama que muestra la distribución de nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP); la Figura 3b es un diagrama que muestra la distribución de nanopartículas control (NP); y la Figura 3c es un diagrama que muestra la distribución de nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) mezcladas con 5 mg de tiamina libre. El eje X representa los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal [Estómago: Sto; porciones del intestino delgado: I1, I2, I3, I4; ciego: Ce]; el eje Y representa la fracción adherida de nanopartículas a la mucosa (mg); y el eje Z representa el tiempo tras la administración (0,5, 1, 3 y 8 horas). Cada valor está representado por la media (n=3; SD fue inferior al 20% de la media).

La Figura 4 es un gráfico que muestra las curvas de bioadhesión para las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) (■), las nanopartículas control (NP) (●), y T-NP co-administrada con 5 mg de tiamina libre (▲). Los datos representan la media \pm SD (n=3).

ES 2 286 951 B1

La Figura 5 es un conjunto de fotografías que permiten visualizar las nanopartículas en tejido de íleon normal (M) y en las placas de Peyer (PP) mediante microscopía de fluorescencia, en concreto, las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) en la mucosa normal (a); las nanopartículas control (NP) en mucosa normal (b); las T-NP en PP (c); y NP en PP (d).

5

La Figura 6 está compuesta por un conjunto de gráficas que muestran el perfil sérico de anticuerpos anti-OVA de tipo IgG2a e IgG1 en ratones BALB/c (n=10). Los anticuerpos fueron cuantificados por ELISA comenzando con una dilución 1:40 del suero, seguida por diluciones dobles seriadas. La inmunización se realizó el día 0 mediante administración única bien de 20 µg de OVA en las diferentes formulaciones por vía subcutánea (a, b), o bien de 100 µg de OVA en las diferentes formulaciones por vía oral (c, d). Las formulaciones fueron OVA-T-NP (▲), OVA-NP (●), y OVA libre (Δ). Los títulos de anticuerpos fueron determinados en el suero de los animales los días 0, 7, 14, 28 y 42. Los títulos se determinaron como la dilución final de la muestra con valores de absorbancia medios superiores a 0,2, comparando con los obtenidos en suero de animales no inmunizados.

La Figura 7 está compuesta por un conjunto de gráficas que muestran el perfil fecal de IgA secretora anti-OVA en ratones BALB/c (n=10). La inmunización se realizó el día 0 mediante administración única bien de 20 µg de OVA en las diferentes formulaciones por vía subcutánea (a, c), o bien de 100 µg OVA por vía oral (c, d). Las formulaciones fueron OVA-T-NP (▲), OVA-NP (●), y OVA libre (Δ). Los títulos de anticuerpos fueron determinados en el suero de los animales los días 0, 7, 14, 28 y 42. Los títulos se determinaron como la dilución final de la muestra con valores de absorbancia medios superiores a 0,2, comparando con los obtenidos en suero de animales no inmunizados.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con unas nanopartículas, en adelante nanopartículas de la invención, que comprenden (i) un polímero biodegradable y (ii) tiamina o un derivado de la misma.

Las nanopartículas de la invención poseen unas adecuadas características físico-químicas, de bioadhesión y especificidad cuando se administran por vía oral, lo que las convierte en sistemas transportadores de fármacos o en sistemas presentadores de antígenos o alérgenos, de gran interés. De hecho, las nanopartículas de la invención pueden prolongar el tiempo de residencia en la mucosa tras su administración oral o a través de otra mucosa del organismo. Dichas nanopartículas pueden ser utilizadas para administrar moléculas biológicamente activas y mejorar su biodisponibilidad, incluyendo fármacos con ventanas estrechas de absorción, así como fármacos originarios de la biotecnología y compuestos o moléculas utilizados para potenciar o inducir respuestas inmunes en un sujeto.

Tal como aquí se utiliza, el término “nanopartícula” se refiere a una estructura formada por un polímero biodegradable modificada en su superficie mediante la unión de tiamina, o un derivado de la misma, que, opcionalmente, puede estar reticulado mediante la adición de un agente reticulante. La unión de la tiamina, o un derivado de la misma, al polímero biodegradable puede ser una unión covalente. La reacción entre el polímero biodegradable y la tiamina, y, opcionalmente, la subsiguiente reticulación, genera entidades físicas características, independientes y observables, cuyo tamaño medio es menor de 1 micrómetro (µm).

Por “tamaño medio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueve conjuntamente en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia, y que se describen, a modo ilustrativo, en la parte experimental que acompaña a los ejemplos descritos más abajo.

Las nanopartículas de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula inferior a 1 µm, preferentemente presentan un tamaño medio comprendido entre 1 y 999 nm, más preferentemente entre 10 y 900 nm, aún más preferentemente entre 100 y 400 nm. El tamaño medio de las partículas se ve influenciado principalmente por la cantidad de tiamina, o su derivado, adicionada (a mayor cantidad de tiamina o derivado de la misma se incrementa el tamaño de la nanopartícula), por la cantidad y peso molecular del polímero biodegradable (a mayor cantidad o peso molecular del polímero biodegradable el tamaño medio de la nanopartícula se incrementa), y por algunos parámetros del procedimiento de producción de dichas nanopartículas, tales como la velocidad de agitación y la temperatura en la etapa de incubación con la fase acuosa que contiene la tiamina.

55

Las nanopartículas de la invención comprenden un polímero biodegradable y tiamina o un derivado de la misma. El término “biodegradable”, tal como aquí se utiliza, se refiere a polímeros que se disuelven o degradan en un periodo de tiempo que es aceptable para la aplicación deseada, en este caso terapia *in vivo*, una vez que se exponen a una solución fisiológica de pH comprendido entre 4 y 9, a una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C. Prácticamente cualquier polímero biodegradable conocido en el estado de la técnica que dé lugar a la formación de nanopartículas puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos polímeros biodegradables incluyen polihidroxiácidos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., y copolímeros de éstos, e.g., poli(ácido láctico-co-glicólico) [PLGA], etc.; polianhídridos; poliésteres; y polisacáridos, e.g., quitosano, etc. El peso molecular de dicho polímero biodegradable puede variar dentro de un amplio intervalo siempre y cuando satisfaga las condiciones establecidas de formar nanopartículas y ser biodegradable.

65

En una realización particular, el polímero biodegradable utilizado es el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en forma anhídrido (PVM/MA), denominado comercialmente Gantrez® AN. Ventajosamente, dicho copolí-

ES 2 286 951 B1

mero de PVM/MA tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 2.400 kDa, preferentemente entre 200 y 2.000 kDa, más preferentemente entre 180 y 250 kDa. Este polímero biodegradable (PVM/MA) resulta particularmente ventajoso ya que se utiliza ampliamente en tecnología farmacéutica debido a su baja toxicidad ($DL_{50} = 8-9$ g/kg por vía oral) y excelente biocompatibilidad. Además, es fácil de obtener, tanto por la cantidad como por su precio. Este polímero biodegradable (PVM/MA) puede reaccionar con distintas sustancias hidrófilas, debida a la presencia de sus grupos anhídridos, sin tener que recurrir a los reactivos orgánicos usuales (glutaraldehído, derivados de carbodiimida, etc.) que poseen una toxicidad importante. En un medio acuoso, el copolímero PVM/MA es insoluble, pero sus grupos anhídrido se hidrolizan dando lugar a unos grupos carboxílicos. La disolución es lenta y depende de las condiciones en que se produce. Debido a la disponibilidad de grupos funcionales en PVM/MA, la unión covalente de moléculas con grupos nucleofílicos, tales como hidróxido o amino, tiene lugar por simple incubación en un medio acuoso.

Las nanopartículas de la invención comprenden, además del polímero biodegradable, tiamina o un derivado de la misma. La tiamina, también denominada vitamina B1, o 3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil]-5-(2-hidroxiethyl)-4-metil-tiazolio cloruro, es un producto conocido. No obstante, también es posible emplear derivados de tiamina, entendiéndose como tales, compuestos estructuralmente relacionados con la tiamina, tales como sus sales, entre las que se encuentran sus sales de adición, por ejemplo, sus sales de adición de ácido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas sales de adición de tiamina incluyen tiamina hidrocioruro, tiamina monofosfato cloruro dihidratada; tiamina pirofosfato; oxtiamina cloruro hidrocioruro; piritiamina hidrobromuro, etc., todos ellos compuestos conocidos. En una realización particular, las nanopartículas de la invención comprenden tiamina o tiamina hidrocioruro.

La tiamina, o el derivado de la misma, pueden encontrarse recubriendo total o parcialmente la superficie de las nanopartículas que comprenden el polímero biodegradable.

La relación tiamina (o derivado de la misma):polímero biodegradable, en peso, en la nanopartícula de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha relación ponderal está comprendida entre 1:10 y 1:500, preferentemente entre 1:10 y 1:100, más preferentemente alrededor de 1:40. En una realización concreta, nanopartículas de la invención con una relación de, aproximadamente, 0,025 mg tiamina/mg polímero biodegradable proporciona una capacidad de adhesión (unión) muy eficiente.

Las nanopartículas de la invención pueden presentar una carga superficial (medida mediante el potencial Z) que varía en función de la estructura del polímero biodegradable y en la proporción de éste con respecto a la tiamina o al derivado de la misma. La contribución de la carga positiva se atribuye, entre otros, a los grupos amino presentes en la tiamina o en su derivado. Dependiendo de los parámetros mencionados, la magnitud de la carga superficial de las nanopartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo. En una realización particular, se han obtenido unas nanopartículas de la invención, a base de copolímero PVM/MA y tiamina, con un potencial Z de alrededor de $-34,0 \pm 1,9$ mV (Ejemplo 1, Tabla 1), mientras que, en otra realización particular, se han obtenido unas nanopartículas de la invención (a base de copolímero PVM/MA y tiamina) cargadas con ovoalbúmina (OVA), con un potencial Z de alrededor de $-28,6 \pm 6,2$ mV (Ejemplo 3, Tabla 3).

Las nanopartículas de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, las nanopartículas de la invención se pueden obtener incubando las nanopartículas de polímero biodegradable previamente formadas con una solución acuosa de tiamina o de un derivado de la misma, lo que permite obtener mayoritariamente nanopartículas de polímero biodegradable en las que la tiamina, o su derivado, se encuentra unida a la superficie de las nanopartículas. En una realización particular, el polímero biodegradable presente en las nanopartículas de la invención es un copolímero de PVM/MA, cuya obtención se describe, por ejemplo, en WO 02/069938.

En general, las nanopartículas pueden obtenerse a partir del polímero biodegradable mediante un procedimiento que comprende la disolución de dicho polímero biodegradable en un disolvente orgánico (e.g., acetona, etc.) y posterior desolvatación tras la adición de un disolvente apropiado, por ejemplo, un disolvente o una mezcla de disolventes miscible con la disolución del polímero biodegradable, tal como una mezcla etanol-agua, obteniéndose una suspensión de nanopartículas de la que se eliminan los disolventes orgánicos por métodos convencionales, por ejemplo, mediante evaporación a presión reducida, y, a continuación, se añade agua, con lo que se obtiene una suspensión acuosa de nanopartículas. La relación, en volumen, fase orgánica:solución hidroalcohólica (etanol/agua) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha relación está comprendida entre 1:1 y 1:10 (v:v).

Tras la eliminación de los disolventes orgánicos, las nanopartículas de polímero biodegradable se modifican en su superficie de manera eficiente con tiamina o con un derivado de la misma, mediante incubación, a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo apropiado. Para ello, sobre dicha suspensión de nanopartículas previamente obtenida se añade una solución acuosa de tiamina o de un derivado de la misma. En una realización particular, se utiliza agua de calidad farmacéutica. Tanto la concentración del polímero biodegradable como la de la tiamina, o su derivado, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración del polímero biodegradable está comprendida entre 0,001 y 10% p/v y la de tiamina, o derivado de la misma, entre 0,001 y 5% p/v.

En general, los grupos amino de la tiamina reaccionan con grupos funcionales eventualmente presentes en el polímero biodegradable, lo que conduce a la formación de enlaces entre el polímero biodegradable y la tiamina. La asociación de la tiamina a las nanopartículas del polímero biodegradable se hace evidente debido al descenso

ES 2 286 951 B1

significativo de la carga negativa superficial de las nanopartículas (véase, por ejemplo, la Tabla 1). En una realización particular, los grupos amino de la tiamina reaccionan con los grupos anhídrido del copolímero PVM/MA, reacción que puede darse fácilmente por la simple incubación de la tiamina con la suspensión acuosa de las nanopartículas, lo que conduce a la formación de enlaces amida entre el copolímero PVM/MA y la tiamina.

5

Las nanopartículas de la invención pueden purificarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial, o evaporación, incluyendo la utilización de vacío.

10 Opcionalmente, se puede añadir un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las nanopartículas de la invención, tal como se describe en WO 02/069938. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes reticulantes que se pueden utilizar incluyen compuestos diaminados, por ejemplo 1,3 diaminopropano, polisacáridos o sacáridos simples, proteínas y, en general, cualquier molécula que presente grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos funcionales presentes en el polímero biodegradable, por ejemplo, grupos anhídrido presentes en el copolímero PVM/MA.

15 Asimismo, si se desea, las nanopartículas de la invención pueden ser liofilizadas por métodos convencionales. Desde un punto de vista farmacológico, es importante poder disponer de nanopartículas en forma liofilizada dado que ello mejora su estabilidad durante el almacenamiento y conservación a largo plazo, además de reducir el volumen del producto que va a ser manipulado. Las nanopartículas de la invención pueden ser liofilizadas en presencia de un agente crioprotector habitual tal como glucosa, sacarosa, manitol, trehalosa, glicerol, lactosa, sorbitol, polivinilpirrolidona, etc., preferentemente, sacarosa o manitol; a una concentración comprendida dentro de un amplio intervalo, preferentemente, entre 0,1% y 10% en peso.

20 Las nanopartículas de la invención presentan elevada capacidad de asociación de moléculas biológicamente activas, lo que las convierte en unos sistemas de transporte de fármacos o de presentación de antígenos y alérgenos muy apropiados.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona a una composición farmacéutica que comprende nanopartículas de la invención y, al menos, una molécula biológicamente activa.

30 En general, dicha molécula biológicamente activa estará en el interior de la nanopartícula de la invención; no obstante, podría suceder que alguna molécula biológicamente activa estuviera también unida a la superficie de la nanopartícula si bien la mayor parte de dichas moléculas estarán en el interior (e.g., encapsuladas) de las nanopartículas de la invención.

35 El término “molécula biológicamente activa”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia utilizada en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o aquella utilizada para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales. En general, dicho término incluye tanto fármacos como antígenos y alérgenos. Según la presente invención, las nanopartículas de la invención pueden incorporar una o más moléculas biológicamente activas independientemente de las características de solubilidad de las mismas. La capacidad de asociación dependerá, por tanto, de la molécula incorporada, pero, en general, dicha capacidad es alta tanto para moléculas hidrófilas como para moléculas de marcado carácter hidrófobo.

40 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende nanopartículas de la invención que contienen uno o más fármacos diferentes. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos fármacos incluyen agentes analgésicos, antiinflamatorios, antitumorales, neuroprotectores, antialérgicos, antiasmáticos, antibióticos (e.g., antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, etc.), surfactantes pulmonares, etc.

50 En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende nanopartículas de la invención que contienen uno o más antígenos diferentes con fines vacunales o bien uno o más alérgenos diferentes con fines inmunoterapéuticos.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “antígeno” se refiere a cualquier sustancia capaz de ser reconocida por el sistema inmune de un sujeto y/o capaz de inducir en un sujeto una respuesta inmune humoral o una respuesta inmune celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T cuando se introduce en un sujeto; a modo ilustrativo, dicho término incluye cualquier producto inmunogénico, nativo o recombinante, obtenido de un organismo superior o de un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito, un protozoo, un hongo, etc., que contiene uno o más determinantes antigénicos, por ejemplo, componentes estructurales de dichos organismos; toxinas, por ejemplo, exotoxinas, etc. Prácticamente cualquier antígeno puede ser utilizado en la elaboración de nanopartículas de la invención cargadas con antígeno. A modo ilustrativo, no limitativo, el término “antígeno” incluye:

60

- antígenos “microbianos”, es decir, antígenos de microorganismos, incluyendo, aunque sin limitarse, virus, bacterias, hongos y parásitos infecciosos; dichos antígenos incluyen el microorganismo intacto así como partes, fragmentos y derivados de los mismos, bien de origen natural o artificial, así como productos sintéticos o recombinantes que son idénticos o similares a los antígenos naturales de un microorganismo e inducen una respuesta inmune específica para ese microorganismo; en este sentido, un compuesto es similar a un antígeno natural de un microorganismo si induce una respuesta inmune (humoral y/o celular) como la del antígeno natural de ese microorganismo; dichos antígenos se utilizan de forma rutinaria por los expertos en la materia; y

65

ES 2 286 951 B1

- antígenos “tumores”, es decir, sustancias, por ejemplo, péptidos, asociadas a un tumor o a un cáncer (“marcador tumoral”), que es capaz de provocar una respuesta inmune, en particular, cuando es presentado en el contexto de una molécula del CMH, e.g., Her2 (cáncer de mama); GD2 (neuroblastoma); EGF-R (glioblastoma maligno); CEA (cáncer de tiroides medular); CD52 (leucemia); proteína gp100 de melanoma humano; proteína melan-A/MART-1 de melanoma humano; tirosinasa; proteína NA17-A nt; proteína MAGE-3; proteína p53; proteína HPV16E7; fragmentos antigénicos de dichos antígenos; etc.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “alergeno” se refiere a una sustancia a la que un sujeto es sensible y provoca una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos alergénicos de pólenes, extractos alergénicos de insectos, extractos alergénicos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o agujones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc., por ejemplo, extractos proteicos de pólenes, tal como el polen de gramíneas, extractos alergénicos de *Lolium perenne*, extractos alergénicos de olea (olivo), etc.; extractos proteicos de insectos, tal como de ácaros del polvo, etc.; extractos alergénicos de componentes alimentarios, etc. Prácticamente cualquier alergeno puede ser utilizado en la elaboración de las nanopartículas cargadas con alergeno de la composición de la invención; no obstante, en una realización particular, dicho alergeno es la ovoalbúmina (OVA), una proteína ampliamente utilizada como modelo alergénico experimental.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas moléculas biológicamente activas que pueden contener las nanopartículas de la invención incluyen antígenos bacterianos: citoplasmáticos, periplásmicos, de la envoltura celular (e.g., proteínas de membrana interna, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y complejos mixtos, proteínas asociadas a la pared celular, etc.), etc.; antígenos de estructuras superficiales (e.g., fimbriae, glicocálix, flagelares, etc.), incluyendo los de patógenos intracelulares, como por ejemplo *Brucella* sp., *Salmonella* sp., etc.; antígenos de microorganismos eucariotas, tanto solubles como superficiales; antígenos virales, por ejemplo, matriciales, de cápsides, de envolturas, internos (incluidos enzimáticos), alergenos de especies animales (ácaros, etc.), de plantas (gramíneas, etc.), etc.

La naturaleza química de la molécula biológicamente activa puede ser muy variada. En una realización particular, dicha molécula biológicamente activa es un polisacárido, una proteína, un péptido o un lípido. En otra realización particular, dicha molécula biológicamente activa es un ácido nucleico (e.g., ADN, ARN, etc.), un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, etc.

Las nanopartículas de la invención se utilizan para modificar la distribución de la molécula biológicamente activa asociada y/o de las nanopartículas convencionales al ser administradas por una vía que dé acceso a alguna mucosa del organismo (incluyendo la vía oral, rectal, nasal, vaginal u ocular).

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de las nanopartículas) para administración oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, vaginal o parenteral; cualquier composición en forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su administración tópica, ocular, nasal o vaginal; o cualquier composición sólida (comprimidos, cápsulas) para su administración oral. En una realización particular, la composición farmacéutica se administra por vía oral. En otra realización particular, dicha composición farmacéutica se administra por vía parenteral.

Las composiciones farmacéuticas descritas comprenderán los excipientes adecuados para cada formulación. Por ejemplo, en el caso de formulaciones orales en forma de comprimidos o cápsulas se incluirán si es necesario agentes aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes de carga, recubrimiento entérico, etc. Las formulaciones sólidas orales se preparan de forma convencional por mezclado, granulación en seco o húmedo e incorporando las nanopartículas de la invención. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulf i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La proporción de la molécula biológicamente activa incorporada en la nanopartícula de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 25% en peso respecto al peso total de las nanopartículas. No obstante, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la moléculas biológicamente activa incorporada.

La incorporación de la molécula biológicamente activa a las nanopartículas de la invención se puede hacer tal como se describe en WO 02/069938, por incorporación a la solución del polímero biodegradable antes de la formación de nanopartículas, o bien posteriormente añadirla a la suspensión acuosa de las nanopartículas ya formadas. Por ejemplo, y dependiendo de la naturaleza de la moléculas biológicamente activa, se puede proceder del siguiente modo:

- a) Moléculas biológicamente activas hidrófobas: adición en la fase orgánica (e.g., acetona) e incubación/solubilización conjunta con el polímero biodegradable durante un periodo de tiempo variable (hasta 1 hora) bajo agitación (agitador mecánico, magnético o ultrasonidos); y

b) Moléculas biológicamente activas hidrófilas: bien mediante

5 adición en la fase orgánica (e.g., acetona) e incubación conjunta con el polímero biodegradable durante un periodo de tiempo variable (hasta 1 hora) bajo agitación (agitador mecánico, magnético o ultrasonidos) hasta obtener una suspensión fina en el disolvente orgánico [este procedimiento ha sido utilizado con éxito para encapsular una proteína modelo (ovoalbúmina, proteína de unos 44 kDa); la incorporación fue eficiente permitiendo una encapsulación elevada de la proteína modelo; o bien mediante

10 adición en la fase acuosa para incubar con las nanopartículas preformadas (es el caso utilizado para encapsular el marcador fluorescente utilizado en los ejemplos que acompañan a esta descripción, rodamina B isotiocianato).

15 Tal como se mencionó previamente, las nanopartículas de la invención producen un efecto estimulador o potenciador de la respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto por lo que pueden ser utilizadas como adyuvante en vacunas o en inmunoterapia. De hecho, las nanopartículas de la invención tienen la capacidad de estimular las dos vías de respuesta inmunitaria (Th1 o Th2), por lo que puede utilizarse en formulaciones vacunales o inmunoterapéuticas. A modo ilustrativo, para una formulación vacunal, se requiere, en general, dependiendo de los mecanismos de patogenicidad del organismo del que procede el antígeno (intracelular o extracelular, toxina dependiente, flagelo dependiente, etc.), una estimulación de la respuesta Th1 (intracelular, como en el caso de *Brucella*, *Salmonella*, etc.)

20 o de respuesta Th2 (extracelular, como en el caso de *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, bacterias enterotoxigénicas, etc.). Asimismo, a modo ilustrativo, para una formulación inmunoterapéutica se requiere una inducción de tolerancia mediante la presencia de los dos tipos de respuesta, es decir, induciendo respuestas Th1 y Th2 de forma balanceada. En una realización particular de la invención, para estimular una respuesta inmunitaria, las formulaciones contendrán nanopartículas de polímero biodegradable y tiamina, y encapsulado en su interior o recubriendo total o parcialmente

25 la superficie de las mismas el antígeno o el alérgeno.

30 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna o composición para inmunoterapia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanopartículas de la invención y un antígeno o alérgeno, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El antígeno o alérgeno puede estar contenido en el interior de dichas nanopartículas y/o recubriendo al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas. Dichos términos “antígeno” y “alérgeno” han sido definidos previamente.

35 El alérgeno o antígeno presente en las nanopartículas de la invención puede estar recubriendo, al menos, parcialmente la superficie de dichas nanopartículas y/o contenido en el interior de dichas nanopartículas. En una realización particular, dicho alérgeno o antígeno está recubriendo la totalidad o parte de la superficie de dichas nanopartículas.

40 En una realización particular, dicha vacuna o composición para inmunoterapia puede encontrarse en cualquier forma farmacéutica de administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, oral, rectal, nasal, sublingual, etc. En una realización particular, dicha vacuna o composición para inmunoterapia se encuentra en una forma farmacéutica de administración por vía oral, mientras que en otra realización particular, dicha vacuna o composición para inmunoterapia se encuentra en una forma farmacéutica de administración por vía parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.), etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

45

La dosis de nanopartículas cargadas con un antígeno o con un alérgeno puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, preferentemente, entre 0,1 y 2 mg por kg de peso corporal.

50 En una realización particular, las nanopartículas de la invención no incorporan el antígeno o alérgeno, sino que éstas se encuentran vacías y se administran en combinación con composiciones vacunales o inmunoterapéuticas que contienen el antígeno o alérgeno, respectivamente, produciéndose un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria tras la administración de dicha composición vacunal o inmunoterapéutica y las nanopartículas vacías. Por tanto, un aspecto adicional de la invención lo constituye un producto que comprende, de forma separada, a) un antígeno o un alérgeno; y b) una composición que comprende dichas nanopartículas basadas en un polímero biodegradable y tiamina, como composición potenciadora de la respuesta inmune frente a dicho antígeno o alérgeno, como combinación para su administración simultánea o secuencial a un sujeto, en la inducción o estimulación de una respuesta inmune frente a dicho antígeno o alérgeno en dicho sujeto.

55

60 La administración combinada de dicha composición vacunal o inmunoterapéutica y de las nanopartículas vacías puede efectuarse de forma simultánea o secuencial, separada en el tiempo, en cualquier orden, es decir, puede administrarse primero la composición vacunal o inmunoterapéutica y, posteriormente, las nanopartículas vacías o viceversa. Alternativamente, dicha composición vacunal o inmunoterapéutica y dichas nanopartículas vacías pueden administrarse simultáneamente. En este caso, la composición vacunal o inmunoterapéutica y las nanopartículas vacías pueden administrarse en la misma composición o bien en composiciones diferentes.

65

La invención se describe a continuación mediante unos ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen la producción de nanopartículas a base de PVM/MA y recubiertas con tiamina que, opcionalmente, contienen un antígeno y ponen de manifiesto la capacidad de dichas nanopartículas para adherirse de forma específica a la mucosa gastrointestinal y, si es necesario, actuar como adyuvante en inmunoterapia o en vacunación.

Procedimiento general de producción de nanopartículas recubiertas con tiamina

El procedimiento general de producción de las nanopartículas de PVM/MA recubiertas con tiamina es una variante del procedimiento general descrito anteriormente [Arbos *et al.*, J. Control. Release, 83 (2002) 321-330]. Este procedimiento comprende la disolución de dicho copolímero en acetona seguido de la adición de etanol. A la solución resultante se le añadió un volumen similar de agua con lo que se formaron instantáneamente en el medio las nanopartículas, bajo la apariencia de una suspensión lechosa. A continuación, se retiraron los disolventes orgánicos (etanol y acetona) mediante evaporación bajo presión reducida, quedando las partículas en una suspensión acuosa estable. La tiamina se incorporó en la fase acuosa que facilita la desolvatación del polímero, dejando actuar la reacción durante un determinado tiempo. Dependiendo del momento en el que se añadió el fármaco, molécula activa o marcador, se obtuvieron distintas formulaciones con diferente disposición de los mismos (véanse los Ejemplos 1 y 3). A modo ilustrativo:

- A. Para obtener formulaciones que contenían el compuesto (fármaco, molécula activa o marcador) adherido a la superficie de las nanopartículas [por ejemplo, un marcador fluorescente], la incubación con el compuesto se llevó a cabo tras haber evaporado los disolventes orgánicos (Ejemplo 1).
- B. Para obtener formulaciones que contenían el compuesto (fármaco, antígeno, etc.) encapsulado en el interior de las nanopartículas [por ejemplo, ovoalbúmina (OVA)], se incubó el compuesto (fármaco o antígeno) disperso en acetona antes de añadir el etanol y el agua (Ejemplo 3).

El siguiente paso consistió en la incubación entre las nanopartículas formadas y la tiamina. Eventualmente, tras este proceso de incubación, se puede adicionar el agente reticulante que, en este caso, ha sido el 1,3-diaminopropano (10 µg/mg polímero).

La purificación de las nanopartículas se llevó a cabo mediante ultracentrifugación. Finalmente, las nanopartículas purificadas se liofilizaron para su almacenamiento y conservación a largo plazo.

Caracterización de las nanopartículas

El tamaño y potencial zeta de las nanopartículas se determinó en un Zetamaster (Malvern Instruments/Optilas, España). La morfología de las nanopartículas se estudió por microscopia electrónica de barrido en un aparato Zeiss DSM940 (Oberkochen, Alemania).

La cantidad de tiamina asociada a las nanopartículas se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de acuerdo con el procedimiento descrito por [Batifoulier *et al.*, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 816 (2005) 67-72]. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldborn, Germany) acoplado a un sistema de detección de ultravioleta (UV) de diodo-array. Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171. Para la separación de tiamina se utilizó una columna de fase reversa Zobrax NH₂ (4,6 mm x 150 mm; 5 µm; Agilent) calentada a 40°C. La fase móvil estaba formada por una mezcla de solución reguladora de fosfatos (PBS) (pH = 6; 50 mM) y metanol (en proporción 80/20 en volumen), y fue bombeada a un flujo de 0,5 mL/min. La detección se realizó a 254 nm.

Para el análisis de las muestras, 1 mL de los sobrenadantes provenientes de la centrifugación de las nanopartículas se dosificó en viales de HPLC. A continuación, una alícuota de 10 µL se inyectó en la columna de HPLC. Finalmente, se calculó la cantidad de tiamina asociada a las nanopartículas como la diferencia entre la cantidad inicial de tiamina y la cantidad de tiamina cuantificada en los sobrenadantes.

La cantidad de rodamina B isotiocianato (RBITC) incorporada en las nanopartículas se determinó por colorimetría a una longitud de onda de 540 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Finlandia). Esta cantidad se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la cantidad cuantificada en los sobrenadantes recogidos durante la etapa de purificación por centrifugación. Para los cálculos, se utilizó una curva de calibrado entre 5 y 100 µg/mL ($r > 0,999$).

La cinética de liberación de RBITC desde las nanopartículas se realizó en tubos de diálisis Vivaspin® 100.000 MWCO (VIVASPIN, Hannover, Germany). Para ello, 5 mg de nanopartículas se dispersaron en 1 mL de medio gástrico simulado (FGS) o medio intestinal simulado (FIS) [USP XXIII] a 37±1°C. A determinados tiempos, las suspensiones de nanopartículas se centrifugaron (5.000 x g, 15 minutos) y la cantidad de RBITC en los líquidos dializados se cuantificó por colorimetría ($\lambda = 540$ nm).

El contenido proteico [principio activo (en este caso ovoalbúmina)] encapsulado en las nanopartículas recubiertas con tiamina se determinó mediante el ensayo con ácido microbicinconónico (Micro BCA, Pierce, EEUU). Para ello,

ES 2 286 951 B1

las nanopartículas se digirieron, a 37°C durante 24 h, con una solución de lauril sulfato sódico (3%) en NaOH 0,1 M. Se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para corroborar el contenido en OVA. Para ello, se disolvieron 5 mg de nanopartículas (OVA-T-NP) en 2 mL de una mezcla de dimetilformamida (DMF) y acetona (1:1 v/v), a -20°C, durante 24 h. La cantidad de OVA se estimó mediante el cálculo de la densidad media de la banda en el gel SDS-PAGE usando el programa Micro Imagé (Version 4.0; Olympus Optical Co., USA). La recta de calibrado se realizó con OVA (0,25-2,5 µg proteína/pocillo).

Estudio de bioadhesión

Este estudio se realizó aplicando un protocolo descrito anteriormente [Arbós *et al.*, Int. J. Pharm., 242 (2002) 129-136], de acuerdo con las regulaciones del Comité responsable de la Universidad de Navarra en línea con la legislación europea sobre animales de experimentación (86/609/EU). De forma breve, una suspensión acuosa con 10 mg de nanopartículas marcadas con RBITC (aproximadamente 45 mg partículas/kg peso) fueron administradas por vía oral a ratas Wistar macho (peso medio de 225 g; Harlan, Spain). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a diferentes tiempos (0,5, 1, 3 u 8 horas tras la administración). En cada animal, la cavidad abdominal fue abierta, el tracto gastrointestinal retirado, lavado con suero salino y cortado en seis regiones anatómicas: estómago (Sto), intestino delgado (I1, I2, I3 e I4) y ciego (Ce). Cada una de las regiones, tras su apertura logitudinal y lavado con PBS (pH = 7,4; 0,15 M), se incubaron en una solución de NaOH 3 M para su digestión. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de metanol y, tras agitación, se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos. Alícuotas de 1 mL de los diferentes sobrenadantes se diluyeron hasta 3 mL con agua purificada y se analizaron en un espectrofluorímetro (λ_{ex} 540 nm y λ_{em} 580 nm; GENios, TECAN, Groedig, Austria). Las rectas de calibrado se prepararon mediante adición de soluciones de RBITC en NaOH 3 N (0,5-10 µg/mL) a segmentos de tejidos control, que fueron sometidos a las mismas etapas de extracción ($r > 0,996$).

Por otra parte, se realizó un estudio de competición para investigar el efecto de la tiamina libre en la capacidad bioadhesiva de las nanopartículas. Para ello, los animales recibieron, de forma simultánea, una mezcla de 10 mg de nanopartículas recubiertas de tiamina y 5 mg de tiamina libre.

Para cada formulación de nanopartículas (NP y T-NP) se determinó su curva de bioadhesión, de la que se estimaron los diferentes parámetros de bioadhesión [Arbós *et al.*, J. Control. Release, 89 (2003) 19-30; Salman *et al.*, J. Control. Release, 106 (2005) 1-13]: Q_{max} , AUC_{adh} , T_{max} , MRT_{adh} y K_{adh} . Q_{max} , representa la máxima fracción adherida a la mucosa y permite estimar la afinidad de las nanopartículas por el sustrato biológico. K_{adh} representa la velocidad de eliminación de la fracción adherida y se calculó con ayuda del programa WinNonlin version 1.5 (Scientific Consulting, Inc.). AUC_{adh} o área bajo la curva, representa la fracción adherida frente al tiempo (expresada en forma de cantidad de marcador adherido con respecto al tiempo) y se evaluó por el método de trapezios hasta t_z (el último punto de muestreo), y permite cuantificar la intensidad del fenómeno bioadhesivo. T_{max} representa el tiempo en el que se produce la máxima adhesión. Finalmente, MRT_{adh} , es el tiempo medio de residencia de la fracción adherida de nanopartículas y permite evaluar la duración relativa de las interacciones adhesivas, tomando como límite el último punto de muestreo.

Los cálculos se realizaron utilizando el programa WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, USA).

Estudios de microscopia de fluorescencia

La visualización de la distribución de las nanopartículas recubiertas de tiamina, se realizó mediante microscopia de fluorescencia. Para ello, los animales de laboratorio recibieron una dosis oral de 10 mg de nanopartículas marcadas con RBITC. Dos horas después de la administración, los animales fueron sacrificados y se extrajeron diferentes porciones del intestino delgado y se lavaron con PBS. Dichas porciones de aproximadamente 0,5 cm de longitud fueron tratadas con Sakura Tissue-Tek Oct[®] Compound (Sakura, Holanda) y congeladas en nitrógeno líquido. Diferentes muestras del tejido fueron cortadas en secciones de 5 µm en un criostato (2800 Frigocut E, Alemania), fijadas a soportes recubiertos con poli-L-lisina (Sigma, España) and almacenadas a -20°C antes de su visualización por microscopia de fluorescencia.

Protocolos de inmunización y muestreo

Los protocolos con animales fueron aplicados de acuerdo con la legislación Europea (86/609/EU). Ratones BALB/c (20 ± 1 g) (Harlan, España) fueron divididos en 6 grupos diferentes de 10 animales cada uno. La estrategia de administración estaba basada en la administración única de una dosis subcutánea u oral. En el caso de la inmunización oral, cada animal recibió un volumen de 200 µL conteniendo 100 µg de ovoalbúmina, libre o encapsulada en nanopartículas recubiertas de tiamina (OVA-T-NP) o en nanopartículas convencionales (OVA-NP). Para los grupos de los animales inmunizados por vía subcutánea (s.c.), la dosis de proteína fue de 20 µg OVA en 50 µL de PBS.

Las muestras de sangre se recogieron del plexo retroorbital en los días 0, 7, 14, 28 y 42 tras la inmunización. Las muestras fueron centrifugadas (3.000 x g, 10 minutos) y conservados como "pool" de cada grupo (10 ratones). Finalmente, cada pool se diluyó con PBS (1:10) y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

Las muestras de heces y su análisis fue realizado siguiendo un protocolo descrito anteriormente [Maciel *et al.*, Braz J Med Biol Res 37 (2004) 817-826]. En este caso, las heces de cada grupo de animales fueron recogidas en los días 1, 7, 14, 28 y 42 tras la inmunización.

ES 2 286 951 B1

Determinación de anticuerpos anti-OVA en suero y heces mediante ELISA

Los anticuerpos anti-OVA en suero se analizaron mediante ELISA con conjugados anti-IgG₁ y anti-IgG_{2a} (Sigma-Aldrich Chemie, Alemania). Brevemente, para la realización de este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos (EB, Thermo Labsystems, Vantaa, Finlandia), en donde se fijó 1 µg de ovoalbúmina disuelto en solución reguladora carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, las placas se bloquearon mediante incubación durante 1 h a 37°C con 1% de albúmina sérica bovina en una solución de PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T). Las placas fueron lavadas y se añadieron los sueros en diluciones seriadas partiendo de 1:40, y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 1 minuto. A continuación, se incubó durante 2 horas el conjugado con peroxidasa, se realizaron otros 5 lavados de 1 minuto, se añadió el sustrato [ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolín-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich Chemie, Alemania)] y se llevó a cabo la lectura a 405 nm en un lector de placas (iEMS Reader MF, Labsystems, Finlandia) tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los títulos finales se determinaron mediante dilución de la muestra hasta obtener una media de OD ≥ 0,2 respecto a la obtenida con suero de ratón no inmunizado.

Los anticuerpos anti-OVA en heces se analizaron mediante ELISA con conjugados anti-IgA. En este caso, tras el recubrimiento de las placas con OVA, éstas se bloquearon mediante la adición, e incubación durante 1 h a temperatura ambiente, de 200 µL de una solución de PBS-T conteniendo 3% de leche descremada. El extracto de las heces se añadió a dos placas y se fueron realizando diluciones seriadas en PBS-T. Dichas placas se incubaron durante 4 h a 37°C. Finalmente, tras el lavado, los pocillos se incubaron con el conjugado anti-IgA marcado con peroxidasa (Nordic Immunological Labs, Holanda).

Análisis estadístico

Los datos de bioadhesión y las características físico-químicas fueron comparados usando el test no paramétrico de Mann-Whitney U-test y el test de t-Student, respectivamente. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos. Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa de estadística SPSS® (SPSS® 10, Microsoft, USA).

Ejemplo 1

Preparación y caracterización de nanopartículas a base del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA)

El proceso que se describe a continuación es válido para la preparación de formas farmacéuticas coloidales de tipo nanopartícula recubiertas con tiamina que pueden ser utilizadas para encapsular o asociar moléculas de naturaleza hidrófila.

1.1. Preparación de nanopartículas control (NP)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] se disolvieron en 5 mL de acetona. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionaron 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se dejó homogeneizar durante 5 minutos. Entonces, la suspensión de nanopartículas fue evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajustó con agua a 10 mL. A la suspensión resultante se le añadieron 100 µL de una solución al 1% v/v de 1,3-diaminopropano, sometiendo el conjunto a agitación magnética durante 5 minutos, y 1,25 mg de rodamina B-isotiocianato (RBITC). La suspensión resultante se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una disolución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofilizó, manteniéndose todas sus propiedades intactas.

1.2. Preparación de nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] se disolvieron en 5 mL de acetona. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionaron 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada conteniendo 2,5 mg de tiamina. La mezcla resultante se dejó homogeneizar y la suspensión de nanopartículas fue evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos, y el volumen final se ajustó con agua a 10 mL. La suspensión resultante se sometió a agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 µL de una solución al 1% v/v de 1,3-diaminopropano, sometiendo el conjunto a agitación magnética durante 5 minutos, y 1,25 mg de rodamina B-isotiocianato (RBITC). La suspensión resultante se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofilizó, manteniéndose todas sus propiedades intactas.

1.3. Características físico-químicas de las nanopartículas

La Tabla 1 resume las características físico-químicas principales de las nanopartículas obtenidas. Las nanopartículas control (NP) muestran un tamaño cercano a los 200 nm con una carga superficial negativa de -51 mV. Por otra parte, las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) eran significativamente mayores (cercasas a los 400 nm) y

mostraban un potencial zeta significativamente menos negativo. Estas nanopartículas (T-NP) mostraban una cantidad de tiamina asociada de 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ nanopartículas (Tabla 1). Por último, es de destacar que la presencia de tiamina no ejerce ningún efecto sobre el rendimiento de fabricación de las nanopartículas. Igualmente, se observaron pequeñas diferencias al comparar la asociación de RBITC para ambas formulaciones.

TABLA 1

Características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez[®] AN (media \pm SD, n = 6)

	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Rendimiento^a (%)	Contenido RBITC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ NP)	Contenido tiamina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ NP)
NP	203 \pm 2	- 51,3 \pm 2,0	82 \pm 2	13,6 \pm 0,1	-
T-NP	376 \pm 6*	- 34,0 \pm 1,9*	81 \pm 2	14,9 \pm 0,6*	15,0 \pm 6,3

^a Rendimiento: Porcentaje de polímero transformado en nanopartículas.

* $P < 0,05$ versus nanopartículas control (Test de t-Student).

Las nanopartículas recubiertas con tiamina mostraban una población de partículas esféricas muy homogénea (Figura 1).

Ejemplo 2

Características bioadhesivas de las nanopartículas y distribución en el tracto gastrointestinal

*2.1. Estudios de liberación *in vitro* de RBITC desde las nanopartículas*

Los estudios *in vivo* para determinar la capacidad bioadhesiva de las diferentes formulaciones se realizaron utilizando nanopartículas marcadas con RBITC. En primer lugar, para asegurar la estabilidad de la asociación del marcador fluorescente a las nanopartículas en las condiciones del tracto gastrointestinal, se realizaron estudios de liberación en medios simulados gástrico (FGS) e intestinal (FIS). La Figura 2 recoge los resultados obtenidos.

En todos los casos, se constató que el porcentaje de RBITC liberado tras 8 horas de incubación, era siempre inferior al 5% de la cantidad asociada a las nanopartículas. Por ello, se puede asumir que la intensidad de fluorescencia y las manchas obtenidas durante la visualización de las imágenes correspondía al marcador fluorescente asociado a las nanopartículas.

2.2. Distribución de la fracción adherida de nanopartículas en el tracto gastrointestinal de animales de laboratorio

La Figura 3 muestra la distribución en el tracto gastrointestinal de las fracciones adheridas de nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) (Figura 3a) o de nanopartículas control (NP) (Figura 3b). Se puede observar que, a los 30 minutos de la administración de las formulaciones de nanopartículas, ambos tipos (NP y T-NP) mostraban la misma capacidad para adherirse a la mucosa del tracto gastrointestinal, principalmente en la zona del estómago y las regiones superiores del intestino delgado (duodeno). Sin embargo, 1 h después de la administración de las nanopartículas, las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) mostraban una capacidad bioadhesiva significativamente mayor y una distribución más homogénea que las nanopartículas control (NP). La cantidad de nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) encontradas adheridas a la mucosa fue de aproximadamente el 45% de la dosis administrada (Figura 3). A las 3 horas posteriores a la administración, las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) mostraban la máxima adhesión (65% de la dosis administrada) y un importante tropismo por el íleon de los animales (porciones I3 e I4 en la Figura 3a).

Por otra parte, cuando a los animales de laboratorio se les administró la mezcla de nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) y la vitamina (tiamina) libre, la capacidad de las nanopartículas para desarrollar interacciones bioadhesivas en el tracto gastrointestinal se vio fuertemente inhibida (Figura 3c). No obstante, la distribución en el tracto y la fracción adherida a la mucosa de esas nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) era similar al perfil observado para las nanopartículas control (NP). Este resultado indica claramente que la adhesión y el tropismo de las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) está dirigido por la presencia de tiamina en su superficie.

2.3. Curvas y parámetros de bioadhesión

Las curvas de bioadhesión fueron obtenidas por representación de la cantidad total de nanopartículas adheridas en el tracto gastrointestinal en función del tiempo tras su administración (Figura 4). La comparación de los perfiles de bioadhesión para las diferentes formulaciones permite observar que las nanopartículas control (NP) muestran un máximo de bioadhesión 30 minutos después de su administración [Figura 4, (●)]. Posteriormente, la cantidad de nanopartículas control (NP) adheridas va cayendo con el tiempo.

Por el contrario, para las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP), el máximo de adhesión se observa 3 horas después de su administración. Además, este máximo representa una cantidad cercana al 65% de la dosis administrada [Figura 4, (■)]. Desde estas curvas se calcularon los parámetros de bioadhesión que permiten comparar el potencial adhesivo de las distintas nanopartículas. Los parámetros están recogidos en la Tabla 2.

En primer lugar, merece la pena destacar que las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) están caracterizadas por una AUC_{adh} (parámetro que mide la intensidad de las interacciones bioadhesivas) 3 veces superior a la observada para las nanopartículas control (NP). Igualmente, el máximo de adhesión (expresado como Q_{max}) de las T-NP era también significativamente mayor que para las NP ($p < 0,01$). Por el contrario, la fracción adherida de T-NP mostraba una velocidad de eliminación (K_{adh}) significativamente mayor que para NP ($p < 0,05$) y un tiempo de residencia medio (MRT_{adh}) de aproximadamente 3,12 horas. Particularmente interesante resultó el hecho de que la co-administración de nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) y vitamina (tiamina) libre, eliminaba las propiedades bioadhesivas de estas nanopartículas (T-NP) [Figura 4, (▲)]. Así, en estas condiciones, los parámetros de bioadhesión estudiados de T-NP eran similares a los calculados para las nanopartículas control (NP) ($p < 0,05$).

Todos estos resultados son coincidentes con estudios previos que han descrito la presencia de receptores de tiamina a lo largo del intestino delgado de ratas y humanos [Casirola *et al.*, J. Physiol. (Lond), 398 (1988) 329-339; Laforenza *et al.*, J. Membr. Biol. 161 (1998) 151-162]. Igualmente se ha descrito que la absorción de tiamina (en animales de laboratorio y humanos) es inhibida por la administración de análogos estructurales de tiamina, como amprolium, oxtiamina y piritiamina [Laforenza *et al.*, J. Membr. Biol. 161 (1998) 151-162; Dudeja *et al.*, Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 281 (2001) C786-C792].

TABLA 2

Parámetros de bioadhesión para las distintas formulaciones de nanopartículas

	Q_{max} (mg)	AUC_{adh} (mg.h)	K_{adh} (h^{-1})	MRT (h)
NP	2,13 ± 0,18	10,95 ± 0,14	0,13 ± 0,08	3,45 ± 0,32
T-NP	6,23 ± 0,34**	32,51 ± 3,31**	0,30 ± 0,02	3,12 ± 0,11
TNP-COM	2,43 ± 0,48	9,72 ± 0,51	0,14 ± 0,03	3,31 ± 0,08

Los resultados se expresan como media ± SD (n =3)

TNP-COM representa los valores obtenidos cuando se administraron conjuntamente las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) con 5 mg de la vitamina libre

Q_{max} (mg): Cantidad máxima de nanopartículas adheridas a la mucosa

AUC_{adh} (mg.h): Area bajo la curva de bioadhesión

K_{adh} (h^{-1}): Velocidad de eliminación de la fracción adherida

MRT_{adh} (h): Tiempo de residencia medio de la fracción adherida de nanopartículas

** $P < 0,01$ vs nanopartículas control (NP y NPT-COM) (Man-Whitney U-test).

2.4. Visualización de la distribución de las nanopartículas adheridas a la mucosa intestinal

La visualización de las nanopartículas marcadas con RBITC en la mucosa gastrointestinal se observó por microscopía de fluorescencia. La Figura 5 muestra varias fotografías que permiten observar la distribución de las nanopartículas en muestras de íleon, 2 horas después de la administración por vía oral de 10 mg de nanopartículas en ratas.

Las nanopartículas control (NP) fueron principalmente detectadas en la capa externa del fleon (mucus que tapiza la mucosa), confirmando la baja afinidad de estos transportadores por la mucosa intestinal (Figura 5b). Por el contrario, las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) se distribuían ampliamente y mostraban una afinidad muy grande por las microvellosidades del intestino (Figura 5a). Por otra parte, dichas T-NP mostraban un tropismo importante para adherirse a las placas de Peyer y para ser internalizadas y/o capturadas por ese tejido linfoide (Figura 5c). Esta captura no se observó para dichas NP (Figura 5d).

Ejemplo 3

Preparación de las nanopartículas conteniendo un antígeno modelo

La capacidad adyuvante de las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) se estudió utilizando ovoalbúmina (OVA) como modelo de antígeno.

3.1. Preparación de nanopartículas control con ovoalbúmina encapsulada (OVA-NP)

5 mg de OVA se dispersaron en 2 mL de agua con ayuda de ultrasonidos (Microson™) o en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento. Esta suspensión se adicionó a una solución de 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] en 3 mL de acetona. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionaron 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se dejó homogeneizar durante 5 minutos. Entonces, la suspensión de nanopartículas fue evaporada bajo presión reducida (Büchi R-144, Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajustó con agua a 10 mL. Las nanopartículas obtenidas tienen OVA encapsulada (OVA-NP). A la suspensión resultante se le añadieron 100 µL de una solución al 1% v/v de 1,3-diaminopropano, sometiendo el conjunto a agitación magnética durante 5 minutos. La suspensión resultante se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultante se liofilizó, permitiendo de ese modo mantener todas sus propiedades intactas.

3.2. Preparación de nanopartículas recubiertas con tiamina con ovoalbúmina encapsulada (OVA-T-NP)

5 mg de OVA se dispersaron en 2 mL de agua con ayuda de ultrasonidos (Microson™) o en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento. Esta suspensión se adicionó a una solución de 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] en 3 mL de acetona. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionaron 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada conteniendo 2,5 mg de tiamina. La mezcla resultante se dejó homogeneizar y la suspensión de nanopartículas fue evaporada bajo presión reducida (Büchi R-144, Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajustó con agua a 10 mL. La suspensión resultante fue sometida a agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente y purificada mediante centrifugación a 27.000 x g durante 20 minutos, recogiendo los sobrenadantes para cuantificar la tiamina unida a las nanopartículas. Posteriormente se añadieron 100 µL de una solución al 1% v/v de 1,3-diaminopropano, sometiendo el conjunto a agitación magnética durante 5 minutos. La suspensión resultante se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultante se liofilizó, permitiendo de ese modo mantener todas sus propiedades intactas.

3.3. Características físico-químicas de las nanopartículas

La Tabla 3 resume las características físico-químicas principales de las nanopartículas resultantes (OVA-NP y OVA-T-NP). La formulación OVA-T-NP mostró un tamaño significativamente mayor (412 nm) que las nanopartículas control (280 nm). Por otra parte, la presencia de OVA afecta ligeramente a la cantidad de tiamina unida a la superficie de las nanopartículas. Así, la presencia de esta proteína (OVA) disminuye en un 20% la cantidad de vitamina (tiamina) unida (12 µg/mg vs 15 µg/mg). La cantidad de OVA encapsulada se determinó, en este caso, mediante densitometría de las bandas de esta proteína en el gel de SDS-PAGE, utilizando el programa Microimage® Versión 4. La cantidad de OVA fue, para OVA-NP y OVA-T-NP, de 12,1±1,4 y 11,6±2,3 µg/mg nanopartículas, respectivamente.

TABLA 3

Características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez® AN conteniendo ovoalbúmina como modelo de antígeno (media ± SD: n = 6)

	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Contenido en OVA (µg/mg)	Contenido en tiamina (µg/mg)
OVA-NP	280 ± 6	- 39,0 ± 1,0	11,6±2,3	-
OVA-T-NP	412 ± 2	- 28,3 ± 6,2	12,1±1,4	12,0 ± 1,1

Ejemplo 4

Estudio de la capacidad adyuvante de las nanopartículas que encapsulan ovoalbúmina

5 La Figura 6 muestra los títulos de IgG2a y IgG1 tras la inmunización oral o subcutánea de ratones Balb/C con una dosis única de los diferentes tratamientos (OVA-NP, OVA-T-NP y proteína libre). La Tabla 4 resume los valores de las áreas bajo las curvas de la respuesta inmune.

10 En la inmunización subcutánea (s.c.), la administración de OVA-T-NP inducía la producción de niveles anticuerpos anti-OVA de tipo Th2 (IgG1) similares a los inducidos por la formulación OVA-NP. Sin embargo, los títulos de IgG2a (correspondientes a una respuesta de tipo Th1) eran al menos 2 veces superiores para OVA-T-NP que para OVA-NP. Todo esto demuestra que con nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) se pueden conseguir niveles más balanceados de perfiles Th1 y Th2, ya que su actividad inductora de niveles de IgG2a (Th1) es bastante superior a la inducida por las nanopartículas control (NP) no recubiertas con esta vitamina (tiamina).

15 En todos los casos, los niveles de anticuerpos anti-OVA generados por ambas formulaciones (OVA-NP y OVA-T-NP) fueron significativamente mayores que cuando se inmunizó con la proteína (OVA) libre.

20 TABLA 4

Valores de áreas bajo las curvas (AUCs) que representan los diferentes perfiles de respuesta inmune expresados en la Figura 6

25

	SC		ORAL	
	AUC Th1	AUC Th2	AUC Th1	AUC Th2
OVA-T-NP	26,5	37	22	24
OVA-NP	16,5	42	1,5	10,5
OVA libre	1,5	7	0	1,5

30

35

Las AUCs se expresan como unidades arbitrarias (título x tiempo)

40

Tras la administración oral, las nanopartículas OVA-NP también mostraron un perfil predominantemente de tipo Th2 (Figura 6). La respuesta oral de tipo Th1 fue muy baja (AUC de 1,5; AUC_{Th2} es 7 veces superior que AUC_{Th1} , ver Tabla 4) y, al mismo tiempo, la respuesta de anticuerpos inducida por la administración oral fue inferior a la descrita tras la administración subcutánea.

45

Por el contrario, la inmunización oral con OVA-T-NP inducía respuestas Th1 y Th2 superiores a las obtenidas con OVA-NP. Además, ambas respuestas eran del mismo orden (Tabla 4). Por otra parte, mientras para las nanopartículas OVA-NP la respuesta inmune por vía s.c. fue significativamente más intensa que por vía oral, para las nanopartículas OVA-T-NP la inducción de anticuerpos anti-OVA por las vías s.c. y oral fueron bastante similares, en especial la respuesta Th1. Estos resultados muestran claramente la capacidad de las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP) para aumentar y potenciar las respuestas celulares de tipo Th1. Esta observación tiene un gran valor al obtenerla en un modelo animal predispuesto al desarrollo de respuestas Th2 [Gieni *et al.*, *Int. Immunol.*, 8 (1996) 1511-1520].

50

Estos resultados concuerdan con otros previos donde se había puesto de manifiesto que la presencia de micropartículas con OVA en las zonas distales del intestino delgado promovía la inducción de respuestas de tipo Th1 [Cronkhite y Michael, *Vaccine*, 22 (2004) 2106-2115]. Esta potenciación de la respuesta Th1 puede estar relacionada con el elevado tropismo de las nanopartículas T-NP por las regiones distales del intestino delgado, así como su captura por las placas de Peyer ricas en células presentadoras de antígenos (Figuras 3-5). En realidad, recientemente se ha establecido que es mucho más fácil inducir la producción de anticuerpos de tipo IgG2a en la porción distal del tracto gastrointestinal donde, según parece, existe un mayor número de células dendríticas que promueven las respuestas celulares o de tipo Th1 [Peng *et al.*, *J. Immunol.*, 176, (2006) 3330-3341; Hattori *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317 (2004) 992-999; Shi *et al.*, *Tumori.*, 91 (2005) 531-538].

55

60

La Figura 7 muestra la evolución de anticuerpos anti-OVA de tipo IgA en las heces de los ratones inmunizados por las vías s.c. u oral. En ambos casos, la inmunización con nanopartículas, independientemente de la vía de administración, indujo la producción de niveles elevados de IgA. Sin embargo, las nanopartículas recubiertas con tiamina (T-NP)

65

ES 2 286 951 B1

inducían la secreción de niveles significativamente mayores de IgA intestinal que las nanopartículas convencionales. Por vía oral, esa diferencia era de 64 veces superior para las nanopartículas OVA-T-NP que para las nanopartículas OVA-NP. Este fenómeno puede estar relacionado con la captura efectiva de las nanopartículas T-NP por las placas de Peyer del tracto gastrointestinal y su paso hacia los linfocitos responsables de la síntesis y secreción a nivel de mucosas de la IgA.

En conclusión, las nanopartículas recubiertas de tiamina (T-NP) han mostrado una capacidad particular para desarrollar interacciones adhesivas en la mucosa gastro-intestinal. Esta capacidad puede ser interesante para aumentar la biodisponibilidad oral de numerosos fármacos. Por otra parte, como adyuvantes de vacunación, estos transportadores poliméricos son capaces de alcanzar las placas de Peyer y potenciar una elevada inducción de anticuerpos frente al antígeno transportado. Además, la respuesta que se genera es humoral (Th2) y celular (Th1), lo cual puede ser de interés para vacunación frente a numerosos patógenos y para inmunoterapia para el tratamiento de alergias.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 286 951 B1

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas que comprenden un polímero biodegradable y tiamina o un derivado de la misma.
- 5 2. Nanopartículas según la reivindicación 1, en las que dicho polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA).
- 10 3. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en las que el copolímero tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 2.400 kDa, preferentemente entre 200 y 2.000 kDa, más preferentemente entre 180 y 250 ka.
- 15 4. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprenden tiamina o tiamina hidrocloreto.
- 5 5. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que la tiamina o su derivado se encuentra recubriendo total o parcialmente la superficie de las nanopartículas.
- 20 6. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que la relación en peso entre la tiamina, o derivado de la misma, y el polímero biodegradable está comprendido entre 1:10 y 1:500, preferentemente entre 1:10 y 1:100, más preferentemente alrededor de 1:40.
- 25 7. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que dichas nanopartículas se encuentran reticuladas.
8. Composición farmacéutica que comprende nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y una molécula biológicamente activa capaz de prevenir, aliviar o curar una enfermedad.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8, que comprende como molécula biológicamente activa una proteína o un péptido.
- 35 10. Composición según la reivindicación 8, que comprende como molécula biológicamente activa un compuesto seleccionado del grupo formado por un ácido nucleico, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido y sus mezclas.
- 40 11. Composición según la reivindicación 8, que comprende como molécula biológicamente activa un agente anti-tumoral o un antígeno para tumores.
- 45 12. Composición según la reivindicación 8, que comprende como molécula biológicamente activa un protector del sistema nervioso central o un glucocorticoide.
- 50 13. Composición según la reivindicación 8, que comprende como molécula biológicamente activa un antígeno para vacunación o un alérgeno para inmunoterapia.
- 55 14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para administración oral.
15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para administración parenteral.
16. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para administración por una vía que dé acceso a alguna mucosa del organismo, preferentemente la vía rectal, oftálmica, vaginal, nasal, pulmonar o sublingual.
- 50 17. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la elaboración de un medicamento.
18. Un liofilizado que comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 55 19. Una vacuna o composición para inmunoterapia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanopartículas según reivindicaciones 1 a 7 y un antígeno o alérgeno, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 20. Vacuna según la reivindicación 19, en la que el antígeno o alérgeno está contenido en el interior de dichas nanopartículas y/o recubriendo al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas.
21. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, en la que dicho antígeno comprende un extracto inmunogénico procedente de un organismo.
- 65 22. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, en la que dicho alérgeno comprende un extracto de polen alérgico, un extracto de insecto alérgico o un extracto de un producto alimenticio alérgico.

ES 2 286 951 B1

23. Un producto que comprende, de forma separada, a) un antígeno o un alérgeno; y b) una composición que comprende nanopartículas basadas en un polímero biodegradable y tiamina según reivindicaciones 1 a 7, como composición potenciadora de la respuesta inmune frente a dicho antígeno o alérgeno, como combinación para su administración simultánea o secuencia) a un sujeto, en la inducción o estimulación de una respuesta inmune frente a dicho antígeno o alérgeno en dicho sujeto.

24. Uso de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmune de Th1, o en la fabricación de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmune de Th2, o en la fabricación de una composición farmacéutica para la estimulación equilibrada de las respuestas inmunes de Th1 y Th2.

25. Procedimiento para la producción de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:

- a) desolvatación de una solución orgánica que comprende un polímero biodegradable, con una solución hidroalcohólica para formar las nanopartículas;
- b) incubación simultánea de las nanopartículas de polímero biodegradable formadas en la etapa a) y la tiamina en una solución acuosa; y
- c) eliminación de los disolventes orgánicos obteniéndose una suspensión acuosa de nanopartículas.

26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que la concentración del polímero biodegradable está comprendida entre 0,001 y 10% p/v y la de la tiamina entre 0,001 y 5% p/v.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 y 26, que comprende etapas adicionales de purificación.

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que comprende además la incorporación de una molécula biológicamente activa mediante su adición en la fase orgánica donde está el polímero biodegradable disuelto, previo a su desolvatación.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que comprende además la incorporación de una molécula biológicamente activa mediante su adición a la suspensión acuosa de las nanopartículas ya formadas.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, que comprende una etapa adicional de liofilización, opcionalmente en presencia de un agente crioprotector, preferentemente sacarosa o manitol.

Figura 1

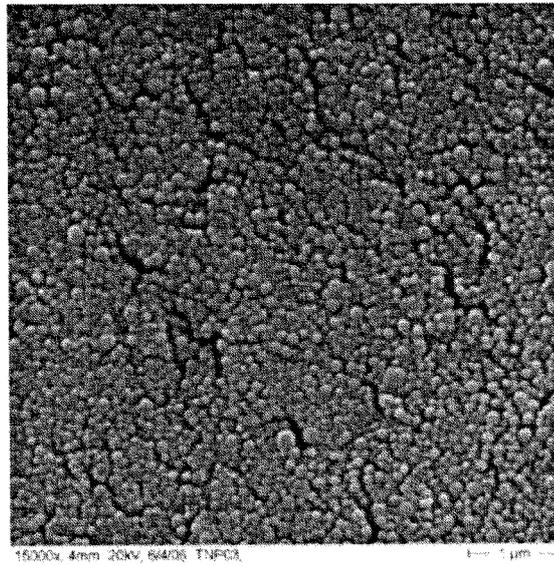


Figura 2

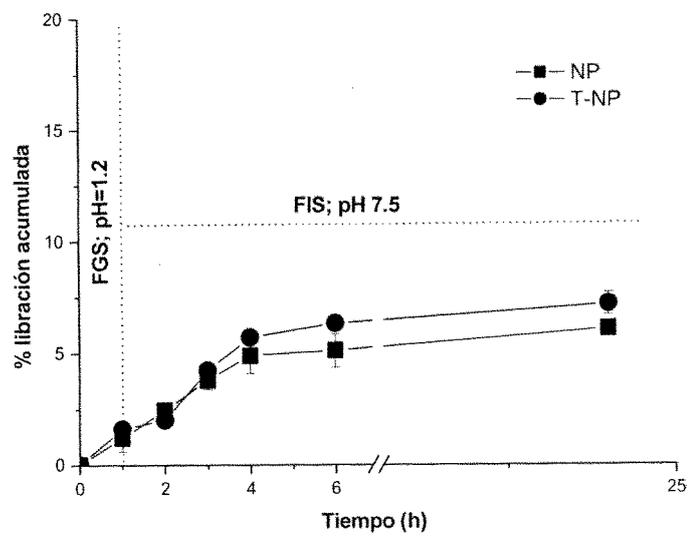


Figura 3

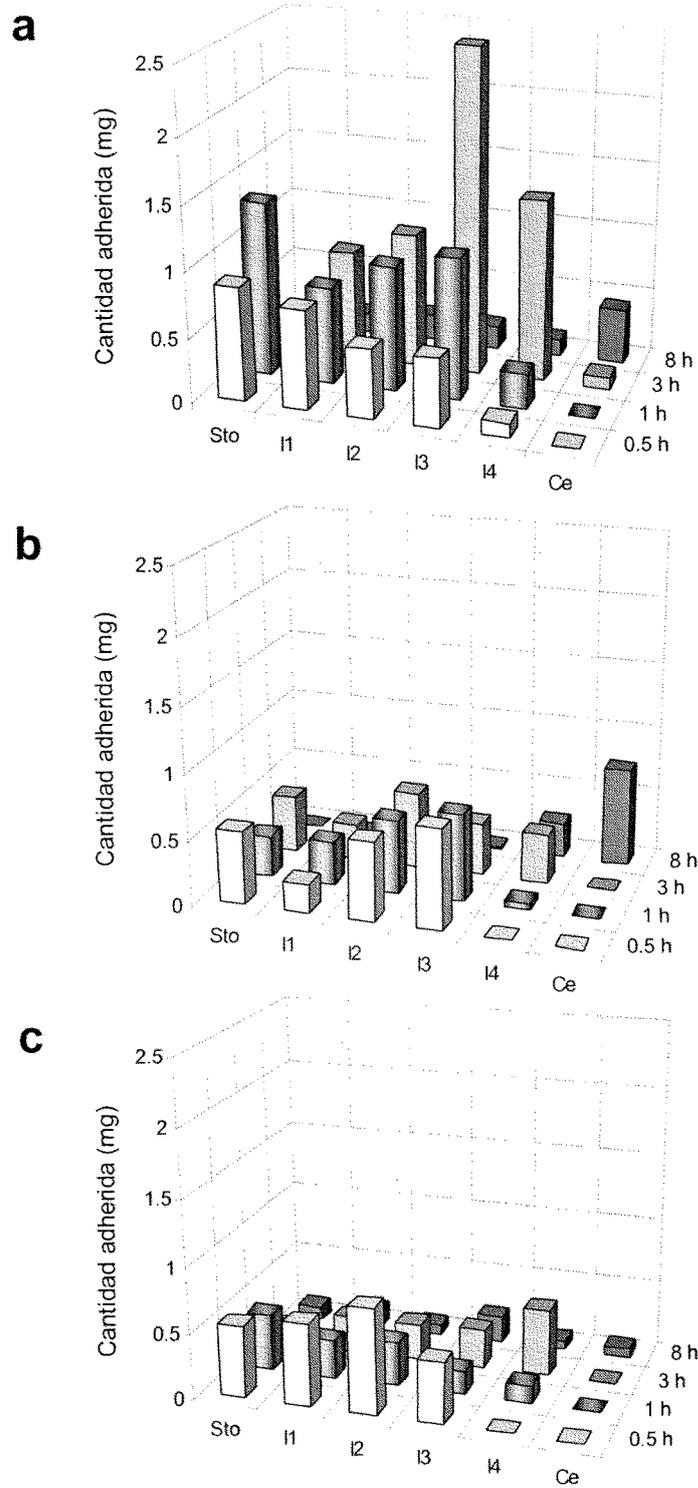


Figura 4

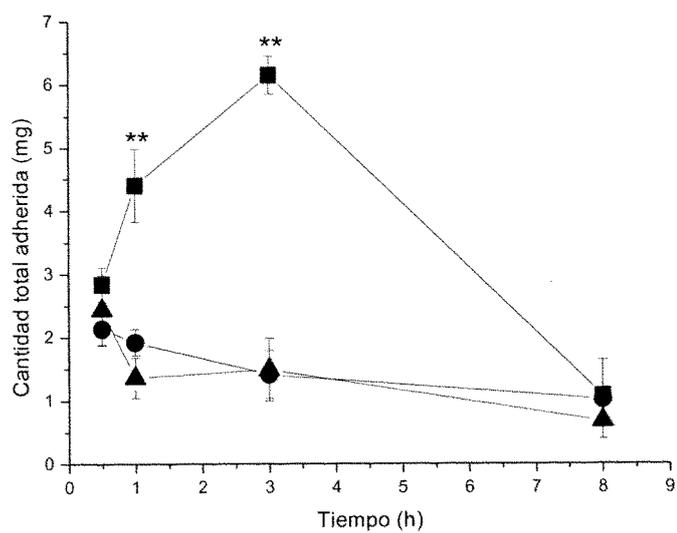


Figura 5

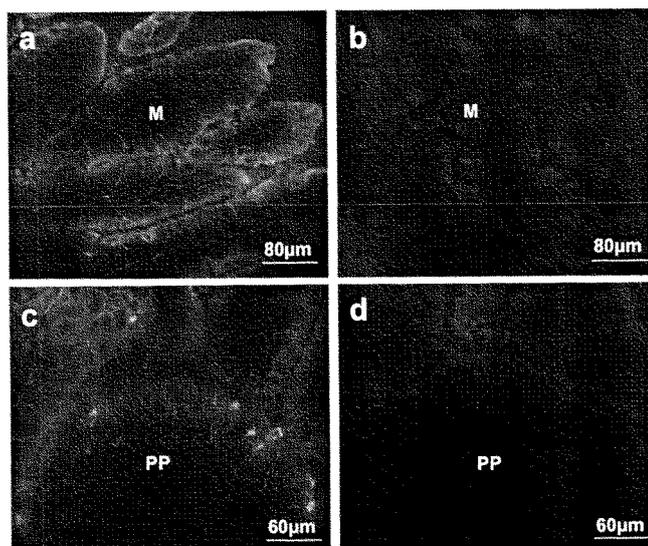


Figura 6

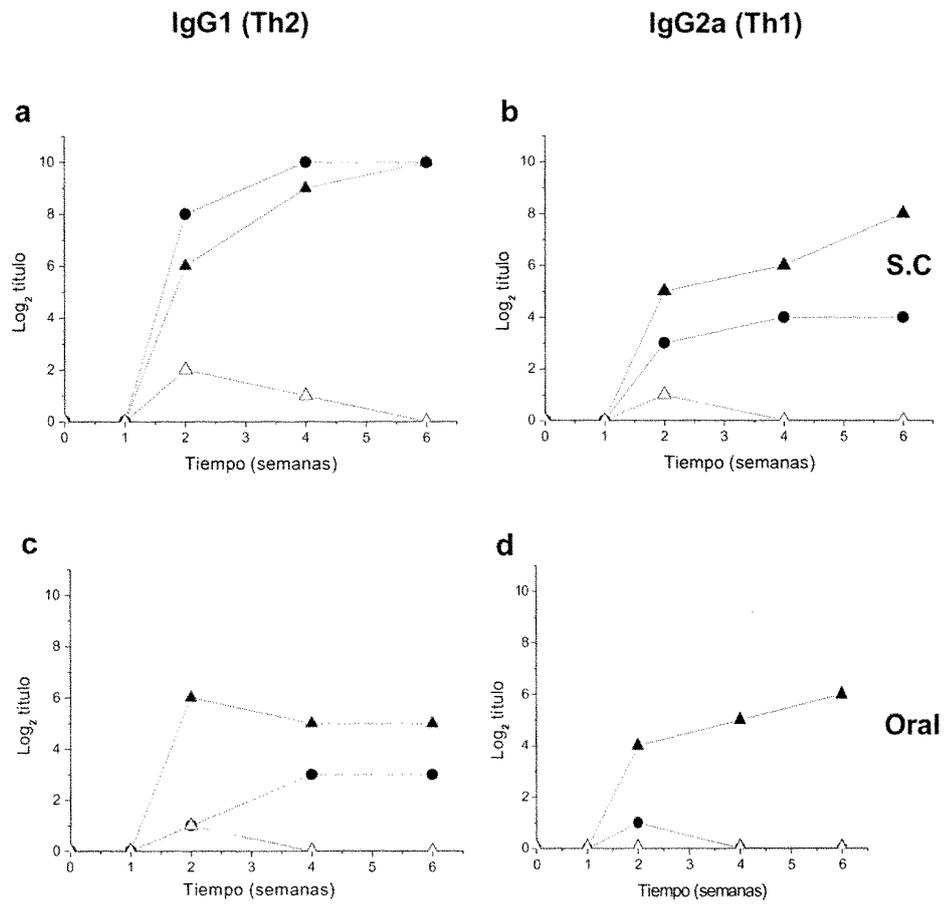
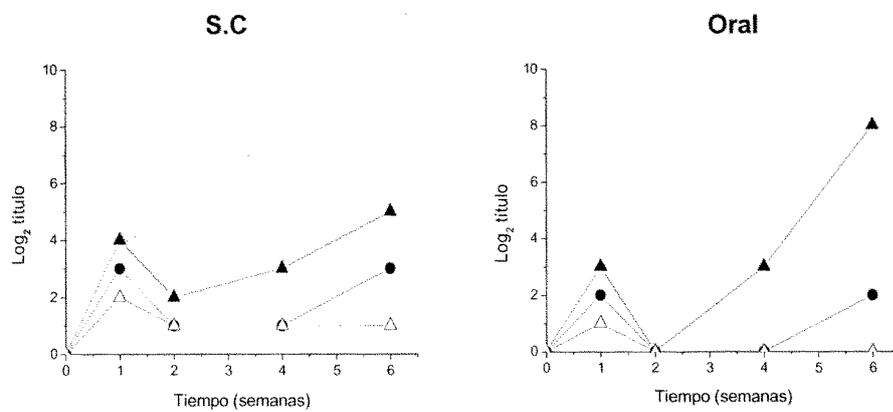


Figura 7





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 286 951

② Nº de solicitud: 200601399

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.05.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2178961 A1 (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.) 01.01.2003, reivindicaciones 1-7,9-11,13,16-19,21,23,24,29, 30-32; página 3, líneas 50-59; página 6, líneas 8-55.	1,2,4-11, 14,15,17, 18,25-30
Y	US 5635382 A (PHILIP S. LOW y otros) 03.06.1997, columna 8, línea 53 - columna 9, línea 5; reivindicaciones 1,12-15.	1,2,4-11, 14,15,17, 18,25-30
Y	ES 2246695 A1 (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.) 16.02.2006, reivindicaciones 1-10,12-20,22-28,31-33; página 4, líneas 33-39,55-66; página 5, líneas 1-47; página 6, líneas 50-58; página 8, líneas 21-58; página 9, líneas 48-61; página 11, líneas 60-68.	1-4,7-9, 13-25, 27-30
Y	US 5688488 A (PHILIP STEWART LOW y otros) 18.11.1997, columna 9, líneas 37-45; reivindicación 1.	1-4,7-9, 13-25, 27-30
A	LOCKMAN, P.R. y col. Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. J. Control. Release (2003) Vol. 93, páginas 271-282.	12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.06.2007

Examinador

J. Pérez-Illzarbe Serrano

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)