



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 246 695**

② Número de solicitud: 200401023

⑤ Int. Cl.:
A61K 9/51 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **29.04.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2006**

Fecha de la concesión: **13.03.2007**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

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

⑦ Inventor/es: **Irache Garreta, Juan Manuel;**
Gamazo de la Rasilla, Carlos;
Ferrer Puga, Marta;
Sanz Larruga, María Luisa;
Gómez Martínez, Sara;
Ochoa Repáraz, Javier;
San Román Aberasturi, Beatriz y
Salman, Hesham H.A.

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Composición estimuladora de la respuesta inmunitaria que comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico.**

⑦ Resumen:

Composición estimuladora de la respuesta inmunitaria que comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico.

La composición estimuladora de la respuesta inmunitaria en un sujeto comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico. Dichas nanopartículas pueden contener, además, un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, los cuales pueden estar contenidos en el interior de dichas nanopartículas y/o recubriendo al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas, y, opcionalmente, un agente reticulante. La composición estimuladora de la respuesta inmunitaria es útil como adyuvante en inmunoterapia y vacunas.

ES 2 246 695 B1

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

DESCRIPCIÓN

Composición estimuladora de la respuesta inmunitaria que comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico.

5

Campo de la invención

La invención se relaciona con el empleo de nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico que, opcionalmente, contienen un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, como adyuvantes en inmunoterapia y vacunas. La invención también se relaciona con composiciones estimuladoras de la respuesta inmunitaria que comprenden dichas nanopartículas.

10

Antecedentes de la invención

Como es conocido, existen antígenos altamente inmunogénicos que son capaces de inducir respuestas inmunitarias protectoras en un sujeto, mientras que existen otros antígenos que no inducen dicha respuesta protectora o bien que inducen una respuesta inmunitaria muy débil. En general, la respuesta inmunitaria del huésped frente a un antígeno débilmente inmunogénico puede ser estimulada mediante la administración conjunta de un adyuvante.

15

Adyuvantes

Un adyuvante es cualquier sustancia que incrementa la respuesta inmune frente a un antígeno con el que se mezcla. Los adyuvantes actúan fundamentalmente mediante tres mecanismos: i) formando un depósito de antígeno o alérgeno en el lugar de aplicación de la vacuna, a partir del cual se va liberando el producto biológicamente activo durante un periodo de tiempo variable; ii) suministrando el antígeno o alérgeno a las células presentadoras de antígeno; e iii) induciendo la secreción de interleuquinas.

20

Algunos ejemplos de adyuvantes clásicos son: las sales de aluminio (alhidrogel) y catecolaminas, (que potencian una respuesta Th2), y el lipopolisacárido de bacterias gram negativas y ciertas secuencias CpG (que potencian la respuesta Th1). Por otra parte, numerosos estudios demuestran que ciertos vectores no biológicos como las micropartículas (partículas esféricas de naturaleza polimérica que recubren alguna sustancia) o los liposomas (vesículas esféricas con una cavidad central acuosa envuelta por un número variable de láminas bimoleculares de fosfolípidos y colesterol) pueden también actuar como adyuvantes [Eldridge *et al*, *Infect Immun*, 59 (1991) 2978-2986; O'Hagan *et al*, *Vaccine*, 18 (2000) 1793-1801; Murillo *et al*, *Vaccine*, 30 (2001) 4099-4106].

25

Otro tipo de vectores no biológicos que pueden ser considerados para su utilización como adyuvantes, son los sistemas coloidales de tipo partícula sólida de tamaño inferior al micrómetro, también llamadas nanopartículas, que se subdividen en nanosferas matriciales y nanocápsulas vesiculares [Orecchioni e Irache, *Formes pharmaceutiques pour application locale*. Lavoisier Tech and Doc., Paris, (1996) 441-457]. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares formados por una cavidad interna que está rodeada por una membrana o pared polimérica. Las nanosferas son formas matriciales, formadas por una red tridimensional polimérica. En ambos casos, las moléculas de la sustancia biológicamente activa pueden estar disueltas, atrapadas o unidas en la estructura macromolecular (en las nanosferas) o encapsuladas por la membrana polimérica (en las nanocápsulas), incluso, puede quedar adsorbida en la superficie de las nanopartículas.

30

En el organismo, la distribución de las nanopartículas es, en general, dependiente de sus características físico-químicas (principalmente el tamaño y sus propiedades de superficie), que determinan su interacción con el medio biológico. Por ello, son formas farmacéuticas particularmente interesantes como adyuvantes en inmunoterapia o en vacunas para la administración de antígenos y/o alérgenos.

35

En general, las potencialidades más importantes que aportan estos vectores de origen no biológico son las siguientes [Couvreur & Puisieux. *Adv. Drug Del. Rev.*, 10 (1993) 141-162]: (i) protegen el material encapsulado de la inactivación química, enzimática o inmunológica en el lugar de administración y de acción; (ii) mejoran el transporte de la molécula biológicamente activa hasta lugares difíciles de alcanzar y de su penetración en la célula; (iii) prolongan el tiempo de residencia del fármaco en el organismo y controlan su liberación; (iv) aumentan la especificidad de acción por concentración selectiva, eficaz y regular del material encapsulado en el blanco celular y/o molecular; y (v) aumentan la estabilidad del material que incorporan durante la fabricación, transporte y almacenamiento del medicamento.

40

45

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 [revisión: Singh *et al*, *Int J Parasitology* 33 (2003) 469-478].

50

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 [Okada *et al*, *J Pharm Sci*, 12 (1995)

55

1-99; Putney *et al*, *Nat Biotechnol*, 16 (1998) 153-157]. En contraposición a los adyuvantes de aluminio, las micropartículas son efectivas en la inducción de respuestas inmunitarias celulares y citotóxicas en ratón [Nixon *et al*, *Vaccine* 14 (1996) 1523-1530; Maloy *et al*, *Immunology* 81 (1994) 661-667; Moore *et al*, *Vaccine* 13 (1995) 1741-1749]. En ratón, la inmunización oral con micropartículas induce potentes respuestas inmunitarias a nivel de mucosas y sistémicas frente a los antígenos encapsulados [Chalacombe *et al*, *Immunology* 176 (1992) 164-168; Eldridge *et al*, *J Control Rel* 11 (1990) 205-214; O'Hagan *et al*, *Novel Delivery Systems for Oral Vaccines* (1994) 175-205]. Esta capacidad es consecuencia de su internalización por células especializadas del tejido linfoide de las mucosas [O'Hagan, *J Anat*, 189 (1996) 477-482]. La inmunización por vía de las mucosas con diferentes sistemas particulados ha demostrado su eficacia frente a distintos patógenos, como *Bordetella pertussis* [Chaill *et al*, *Vaccine* 13 (1995) 455-462; Jones *et al*, *Vaccine* 15 (1997) 814-817; Shahin *et al*, *Infect Immun*, 63 (1995) 1195-1200; Conway *et al*, *Vaccine* 19 (2001) 1940-1950], *Chlamidia trachomatis* [Whittum-Hudson *et al*, *Nat Med* 2 (1996) 1116-1121], *Salmonella Typhimurium* [Allaoui-Attarki *et al*, *Infect Immun* 65 (1997) 853-857] y *Brucella* [Murillo *et al*, *Vaccine*, 19 (2001) 4099-4106].

Uso de adyuvantes en inmunoterapia

Las enfermedades alérgicas son una patología emergente causada por una respuesta inmune adversa (reacción de hipersensibilidad) a macromoléculas intrínsecamente inocuas, denominadas alérgenos. Esta hipersensibilidad afecta aproximadamente a un 30% de la población mundial, principalmente en los países industrializados. Es responsable de enfermedades tales como rinitis alérgica, asma extrínseco, alergias alimentarias y alergias a fármacos y a insectos [Settipane *et al*, *Allergy Proc*, 15 (1994) 21-25].

En España, la prevalencia de este tipo de enfermedades en la población de 4 a 17 años es de un 13,3%; de entre ellas, el 6,4% se manifiesta como asma bronquial, siendo la tasa de fallecimientos por asma en nuestro país de 1,5/100.000 habitantes.

La teoría mecanicista de la causa de las enfermedades alérgicas argumenta que se dan por una alteración del equilibrio entre los dos tipos fundamentales de respuestas que se pueden originar tras la activación de los linfocitos T cooperadores: Th1 y Th2. Las citoquinas presentes en el medio externo a la célula influyen de manera determinante en la diferenciación de las células T inmaduras (Th0), de tal modo que la presencia de interleuquina 12 (IL-12), interferón gamma (IFN- γ), interleuquina 18 (IL-18) e interferón alfa (IFN- α), inducen la diferenciación hacia Th1, la cual se caracterizará principalmente por la producción de grandes cantidades de IFN- γ y, en menor medida, de interleuquina 2 (IL-2) e interferón beta (IFN- β). La posterior estimulación de linfocitos B, en este tipo de respuesta, dará lugar a la producción de IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃. Por otro lado, si la célula Th0 se encuentra en un entorno donde predomina la interleuquina 4 (IL-4) y la prostaglandina E2 (PGE2), se inducirá la diferenciación hacia Th2, caracterizándose por la síntesis de elevadas cantidades de IL-4, interleuquina 5 (IL-5) e interleuquina 13 (IL-13), y por la síntesis de IgG₁ e IgE, biotipo directamente implicado en el proceso desencadenante [Hannah *et al*, *Ann Rev Immunol*, 21 (2003) 579-628].

La importancia del predominio de una respuesta tipo Th2, alérgeno-específica, en las enfermedades alérgicas, ha sido corroborada por un elevado número de estudios [Romagnani, *Ann Rev Immunol*, 12 (1994) 227; Bousquet *et al*, *Allergy*, 53 (1998) 1-42; Majori *et al*, *Clin Exp Allergy*, 30 (2000) 341-347]. Se ha demostrado, tanto en modelos animales como en el hombre, que las células con un fenotipo Th2, son las únicas capaces de reconocer directamente péptidos alérgicos y participar en la producción de IgE por parte de linfocitos B, la activación de mastocitos y la producción, maduración y activación de eosinófilos [Cohn *et al*, *Pharmacology and Therapeutics*, 88 (2000) 187-196].

Por tanto, el predominio funcional Th2 sobre las células Th1 conduciría a la respuesta alérgica, mientras que el predominio funcional Th1 sobre las células Th2, la inhibiría [Martín *et al*, *Alergol Immunol Clin*, 17 (2002) 104-110].

Otros estudios defienden que la inhibición de una respuesta Th2 con predominio Th1 podría llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes, por lo que sería más correcto potenciar una regulación inmunitaria del balance Th1/Th2, mediante el aumento de la población de linfocitos T reguladores (Tr) y de IL-10 y factor R de crecimiento de células T (TGF- β). Esto conduciría a la síntesis de anticuerpos IgG₄ e IgA (no mediadores de respuestas inflamatorias), y a la supresión de la producción de IgE por parte de las células B [Akdis *et al*, *Immunology*, 103 (2001) 131-136; Akdis *et al*, *J Clin Invest*, 102 (1998) 98-106; Blaser *et al*, *Int Arch Allergy Immunol*, 117 (1998) 1-10]. Estudios recientes reafirman la importancia de la IL-10 en la inactivación de las células Th2 (Grunig *et al*, *J Exp Med*, 185 (1997) 1089-1099; Adachi *et al*, *Int Arch Allergy Immunol*, 118 (1999) 391-394], e incluso se ha encontrado que la administración *in vivo* de IL-10 tiene consecuencias beneficiosas en animales alérgicos [Zuany-Amorim *et al*, *J Clin Invest*, 95 (1995) 2644-2651; Stampfli *et al*, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21 (1999) 586-596; Hall *et al*, *Vaccine*, 21 (2003) 549-561]. Esto permite suponer que la IL-10 tiene un importante papel regulador en la hiperreactividad de las células Th2 característica de pacientes alérgicos.

La IL-10 puede tener importantes implicaciones fisiopatológicas para contrarrestar enfermedades inflamatorias (enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, etc.), ciertas infecciones víricas (hepatitis C, infecciones causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), etc.), o incluso inhibir los efectos secundarios del trasplante de órganos. Por ello, la aplicación directa de IL-10, o bien el empleo de adyuvantes que estimulen la producción de IL-10, podría tener un gran impacto en el tratamiento de estas enfermedades [Asadullah *et al*, *Pharmacol Rev*, 55, (2003) 241-269]. Actualmente, se está estudiando como posible tratamiento en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide [Feldman *et al*, *Annu Rev Immunol* (1996) 397-440; Katsikis *et al*, *J Exp Med* (1994) 1517-1527;

ES 2 246 695 B1

Chomarat *et al*, *J Immunol* (1995) 1432-1439]. El papel antiinflamatorio y regulador de la citoquina la hace esencial, por tanto en respuestas excesivas tanto Th1 (enfermedades autoinmunes) como Th2 (alergia).

5 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.

10 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 proveer protección contra los síntomas alérgicos y las reacciones inflamatorias asociadas con la exposición natural a estos alérgenos [Jutel, M., *J Immunol*, 154 (1995) 4178-4194].

15 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 como el control mediante vacunación frente a parásitos intracelulares bacterianos (como *Brucella* y *Salmonella*).

20 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 [Taudorf *et al*, *J Allergy Clin Immunol* (1987) 153-161; Creticos *et al*, *J Allergy Clin Immunol* (1990) 165]. Además, la mucosa gastrointestinal actúa como una barrera muy poco permeable a la absorción de estas macromoléculas.

35 Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que las nanopartículas de copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico que, opcionalmente, contienen un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, 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. Dichas nanopartículas son estables en administración oral, presentan buenas características bioadhesivas y, por tanto, pueden ser utilizadas en inmunización o inmunoterapia por diferentes vías, incluyendo la vía oral, sin necesidad de utilizar dosis de alérgeno o antígeno tan elevadas como las mencionadas en el estado de la técnica. Además, dichas nanopartículas son poco tóxicas, biodegradables y de fácil producción.

40 *Nanopartículas de copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico*

45 La solicitud de patente WO 02/069938, del mismo solicitante, describe unas nanopartículas de copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA), un procedimiento para su obtención y su empleo como vehículo de fármacos. Dicho copolímero de PVM/MA está compuesto estructuralmente por dos grupos funcionales diferenciados que tienen características de solubilidad diferentes: un grupo éster hidrofóbico y otro grupo anhídrido. El grupo carboxílico es un solubilizante, ya que tiende a disolver el polímero cuando se ioniza, y el grupo éster es hidrofóbico, ya que retrasa la penetración del agua en el polímero [Heller *et al*, *J Appl Polym Sci*, 22 (1978) 1991-2009]. Los copolímeros de PVM/MA sintéticos tienen aplicaciones muy diversas. El Gantrez® AN se utiliza ampliamente como espesante y floculante, adhesivo dental, excipiente en comprimidos bucales, excipiente en parches transdérmicos, etc. Por otra parte se ha descrito el uso de estos copolímeros para la liberación controlada de fármacos [Heller *et al*, *J Appl Polym Sci*, 22 (1978) 1991-2009], y, en formas matriciales, para la liberación tópica de fármacos en el ojo [Finne *et al*, *J Pharm Sci*, 80 (1991) 670-673; Finne *et al*, *Int J Pharm*, 78 (1992) 237-241].

55 Las nanopartículas a base de PVM/MA tienen características bioadhesivas [Arbós *et al*, *Int J Pharm*, (2002) 129-136] por lo que, cuando se administran por vía oral, pueden interactuar con las placas de Peyer, que contienen el 20% de linfocitos totales del organismo, y desencadenen una respuesta inmune amplificada respecto a la de los antígenos y/o alérgenos administrados en solución acuosa.

60 Las nanopartículas a base de PVM/MA son sistemas coloidales capaces de retener sustancias biológicamente activas mediante: (i) solución o atrapamiento dentro de la estructura macromolecular o matriz; (ii) unión covalente del fármaco con los grupos anhídrido del copolímero; y (iii) procesos de adsorción mediados por enlaces débiles. Asimismo, la extrema reactividad del copolímero de PVM/MA, debido a los grupos anhídridos cíclicos, contribuye a su capacidad para el atrapamiento de moléculas, fármacos u otras sustancias. En la solicitud de patente WO 02/069938 se describe el empleo de dichas nanopartículas de copolímero de PVM/MA como vehículo de fármacos, concretamente, 65 5-fluorouridina, ganciclovir y el oligonucleótido antisentido ISIS 2922.

Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria en un sujeto, útil como adyuvante en inmunoterapia y vacunas, estable cuando se administra por vía oral, con buenas características bioadhesivas para su interacción con mucosas, capaz de transportar, opcionalmente, un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante y liberar dichos productos de forma controlada, útil, por tanto, en inmunización o inmunoterapia por diferentes vías, incluyendo la vía oral.

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que las nanopartículas de copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico que, opcionalmente, contienen un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, 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. Especialmente se ha encontrado que dichas nanopartículas son fáciles de producir, poseen buenas características bioadhesivas, son poco tóxicas y biodegradables (es decir, 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 6-9 y temperatura comprendida entre 25°C y 40°C).

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria, que comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico. Dichas nanopartículas pueden contener, además, un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, los cuales pueden estar contenidos en el interior de dichas nanopartículas y/o recubriendo al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas. Asimismo, si se desea, dichas nanopartículas pueden contener un agente reticulante. Opcionalmente, dicha composición puede estar en forma de liofilizado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna o composición para inmunoterapia que comprende dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria. En una realización particular, dicha vacuna o composición para inmunoterapia es una formulación adecuada para su administración por vía oral, mientras que en otra realización particular, dicha vacuna o composición para inmunoterapia es una formulación adecuada para su administración por vía parenteral.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria en la elaboración de una vacuna o composición para inmunoterapia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmunitaria Th1, o en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmunitaria Th2, o en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación, de forma balanceada, de las respuestas inmunitarias Th1 y Th2.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria que comprende dichas nanopartículas a base de PVM/MA y un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante que comprende la adición de dicho alérgeno o antígeno y/o agente inmunoestimulante a una solución orgánica que comprende dicho copolímero de PVM/MA antes de proceder a su desolvatación con una solución hidroalcohólica, o, alternativamente, incubar dicho alérgeno o dicho antígeno y/o con dicho agente inmunoestimulante con dichas nanopartículas de PVM/MA. Dicho procedimiento puede comprender, además, etapas adicionales de eliminación de los disolventes orgánicos y/o purificación, así como etapas de estabilización de las nanopartículas obtenidas mediante el uso de agentes reticulantes. Opcionalmente, dicho procedimiento puede comprender una etapa adicional de liofilización.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que representa la ovoalbúmina liberada (%) desde las formulaciones NP-I, NP-II, NP-III y NP-IV respecto al tiempo (días).

La Figura 2 es una gráfica que representa los niveles de anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina (IgG₁, IgG_{2a}) tras inmunización de ratones Balb/c vía intradérmica de solución libre de ovoalbúmina (OVA), ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum), nanopartículas vacías (NP), NP-I, NP-II, NP-III y NP-IV frente al tiempo.

La Figura 3 es una gráfica que representa los niveles de anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina (IgG₁, IgG_{2a}) tras inmunización de ratones Balb/c vía oral de solución libre de ovoalbúmina (OVA), nanopartículas vacías (NP), NP-I, NP-II, NP-III y NP-IV frente al tiempo.

La Figura 4 es una gráfica que representa los niveles de anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina (IgG₁, IgG_{2a}) tras inmunización de ratones Balb/c vía oral con distintas dosis de ovoalbúmina encapsulada (NP-III25 y NP-III50) y nanopartículas vacías (NP) frente al tiempo.

La Figura 5 es una gráfica que representa los niveles de anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina (IgG₁) tras inmunización de ratones Balb/c vía intradérmica de solución de ovoalbúmina (OVA), ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum), nanopartículas vacías (NP), NP-I, NP-III, NP-V, NP-VI y NP-VII frente al tiempo.

ES 2 246 695 B1

La Figura 6 es una gráfica que representa los niveles de anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina (IgG_{2a}) tras inmunización de ratones Balb/c vía intradérmica de solución libre de ovoalbúmina (OVA), ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum), nanopartículas vacías (NP), NP-I, NP-III, NP-VI, NP-VI y NP-VII frente al tiempo.

5 La Figura 7 es una gráfica que representa la concentración de IL-10 en suero tras inmunización de ratones Balb/c vía intradérmica de solución libre de ovoalbúmina (OVA), ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum), nanopartículas vacías (NP), NP-I, NP-III, NP-V, NP-VI y NP-VII frente al tiempo.

10 La Figura 8 es una gráfica que representa los niveles de anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina (IgG₁, IgG_{2a}) tras inmunización de ratones Balb/c vía intradérmica de ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum), OVASAL y solución de ovoalbúmina (OVA) frente al tiempo.

15 La Figura 9 muestra el resultado de la separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) del extracto HE y tinción de Coomassie para proteínas (10 µg de extracto por pocillo).

La Figura 10 muestra el resultado de un análisis por inmunoblotting del extracto HE antes (A) y después (B) de la encapsulación, empleando una mezcla de sueros de gallinas infectadas.

20 La Figura 11 es una gráfica que ilustra los resultados de un experimento de protección de ratones Balb/c por vía intraperitoneal con una dosis letal de 10² unidades formadoras de colonia (UFC) de *S. Enteritidis* 3934.

La Figura 12 es un diagrama de barras que muestra la liberación de IFN-γ (A) e IL-4 (B) por células esplénicas de ratones Balb/c re-estimuladas con extracto HE.

25 La Figura 13 es un diagrama de barras que muestra el resultado de un ELISA indirecto de sueros de ratones Balb/c frente a extracto HE, empleando anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a}.

Descripción detallada de la invención

30 Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que las nanopartículas de copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico que, opcionalmente, contienen un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, 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.

35 El término “sujeto” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier animal que posee sistema inmunitario, preferentemente, mamíferos, más preferentemente, el ser humano.

En un aspecto, la invención se relaciona con una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria, en adelante composición de la invención, que comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico. Dichas nanopartículas pueden contener, además, un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, los cuales pueden estar contenidos en el interior de dichas nanopartículas y/o recubriendo al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas. Asimismo, si se desea, dichas nanopartículas pueden contener un agente reticulante.

45 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “nanopartículas” se utiliza para designar sistemas coloidales de tipo partícula sólida de tamaño inferior a 1,0 micrómetro, preferentemente del orden de 10 a 900 nanómetros (nm), e incluye nanosferas matriciales y nanocápsulas vesiculares. En una realización particular, dichas nanopartículas tienen un tamaño medio igual o inferior a 400 nm.

50 Las nanopartículas presentes en la composición de la invención comprenden un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico, también denominado poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) o PVM/MA. Dicho copolímero de PVM/MA es un producto conocido que puede obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante polimerización de acetileno con anhídrido maleico o bien puede adquirirse comercialmente. En este sentido, la compañía Internacional Speciality Products (ISP) produce copolímeros de PVM/MA de diferente peso molecular que comercializa bajo la marca comercial Gantrez[®] AN]. En general, para la puesta en práctica de la presente invención, el peso molecular de dicho copolímero de PVM/MA puede variar dentro de un amplio intervalo, preferentemente, entre 100 y 2.400 kDa, más preferentemente entre 200 y 2.000 kDa. En una variante de la invención se prefiere un copolímero de PVM/MA con un peso molecular comprendido entre 180 y 250 kDa.

60 El empleo de dicho copolímero PVM/MA resulta muy ventajoso ya que se utiliza ampliamente en tecnología farmacéutica debido a su baja toxicidad (DL 50 = 8-9 g/kg por vía oral) y su excelente biocompatibilidad. Además, es de fácil obtención y puede reaccionar con distintas sustancias hidrófilas, debido a sus grupos funcionales, sin tener que recurrir a los reactivos orgánicos usuales (glutaraldehído y derivados de carbodiimida) que poseen una toxicidad importante [Arbós *et al.*, *J. Controlled Rel.*, 83 (2002) 321-330]. En un medio acuoso, el copolímero PVM/MA es insoluble, pero el grupo anhídrido presente en el mismo se hidroliza generándose grupos carboxílicos. La solución es lenta y depende de las condiciones en las que se produce. Debido a la disponibilidad de grupos funcionales en PVM/MA, la unión covalente de moléculas con grupos nucleofílicos, tales como hidroxilos o aminas tiene lugar por simple incubación en un medio acuoso. Asimismo, dichas nanopartículas de PVM/MA poseen propiedades bioadhesivas [Arbós *et*

al, *Int J Pharm.*, (2002) 129-136], por lo que, administradas por vía oral, pueden interactuar con las placas de Peyer, que contienen el 20% de linfocitos totales del organismo, y desencadenar una respuesta inmune amplificada respecto a la de los antígenos y/o alérgenos administrados en solución acuosa.

5 En una realización particular, la composición de la invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA que carecen de antígeno o alérgeno y de agente inmunoestimulante. Dichas nanopartículas se denominan nanopartículas “vacías” en esta descripción y pueden obtenerse fácilmente mediante un procedimiento como el descrito en la solicitud de patente WO 02/069938, cuyo contenido se incorpora en su totalidad, por referencia, a esta solicitud de patente. A modo ilustrativo, dichas nanopartículas vacías se preparan fácilmente por desolvatación con una fase hidroalco-
10 hólica de una solución en acetona de un copolímero de PVM/MA. Las nanopartículas formadas se pueden dejar en una suspensión acuosa estable o bien se pueden liofilizar. Opcionalmente se puede adicionar un agente reticulante. Prácticamente cualquier agente reticulante que contenga uno o más grupos funcionales que puedan reaccionar con los grupos anhídrido del copolímero de PVM/MA puede utilizarse, ventajosamente, una poliamina o un glúcido, tal como un aminoácido, una proteína, una osa, un óxido, etc., por ejemplo, lisina, arginina, histidina, proteínas hidrosolubles,
15 poli-L-lisina, poli-L-arginina, etc., preferentemente, 1,3-diaminopropano.

Dichas nanopartículas vacías pueden actuar como adyuvante en vacunación o en inmunoterapia cuando se administran en conjunción con vacunas o composiciones para inmunoterapia (composiciones inmunoterapéuticas) contienen un antígeno o un alérgeno, respectivamente, produciéndose un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria tras la
20 administración de la vacuna o de la composición inmunoterapéutica y las nanopartículas vacías. La Figura 12 muestra cómo la administración de nanopartículas vacías induce la secreción de cantidades significativas de IFN- γ . La administración combinada de una vacuna o de una composición inmunoterapéutica y de las nanopartículas puede efectuarse de forma simultánea o secuencial, separada en el tiempo, en cualquier orden, es decir, puede administrarse primero la vacuna o la composición inmunoterapéutica y, a continuación, las nanopartículas o viceversa. Alternativamente, dicha
25 vacuna o composición inmunoterapéutica y dichas nanopartículas pueden administrarse simultáneamente. Asimismo, la vacuna o composición inmunoterapéutica y las nanopartículas pueden administrarse en la misma composición o bien en composiciones diferentes. La dosis de nanopartículas vacías a administrar 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.

30 En otra realización particular, la composición de la invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA cargadas con un alérgeno o un antígeno y/o con un agente inmunoestimulante.

35 En una variante de esta invención, la composición de la invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA cargadas con un alérgeno o con un antígeno, en donde dichas nanopartículas a base de PVM/MA comprenden un alérgeno o un antígeno.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “alérgeno” se refiere a una sustancia a la que un sujeto es sensible y provoca una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos alérgénicos de pólenes, extractos alérgénicos de insectos, extractos alérgénicos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones 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.. Así, por ejemplo, pueden utilizarse extractos proteicos de pólenes, tal como el polen de gramíneas (*Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*), de otras hierbas (tales como
45 *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*), o de árboles (tales como *Olea europea*, *Platanus sp*, *Cupressus sp*), etc.. Pueden utilizarse también extractos proteicos de insectos, tal como de ácaros del polvo (tales como *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acaros Siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*), etc.; Otros extractos alérgénicos pueden obtenerse de hongos y epitelios animales (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, epitelio de perro, epitelio de gato, epitelio de caballo, mezcla de plumas, *Penicillium notatum*), así como de componentes alimentarios, etc. Prácticamente cualquier alérgeno puede ser utilizado en la elaboración de las nanopartículas cargadas con alérgeno de la composición de la invención; no obstante, en una realización particular, dicho alérgeno es la ovoalbúmina (OVA), una proteína ampliamente utilizada como modelo alérgénico experimental.

55 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “antígeno” se refiere a un 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
60 utilizado en la elaboración de las nanopartículas cargadas con antígeno de la composición de la invención; no obstante, en una realización particular, dicho antígeno es el extracto HE de *Salmonella Enteritidis*.

Como es conocido, *Salmonella Enteritidis* es el agente causal de gastroenteritis humana más frecuentemente detectado en brotes de toxoinfección alimentaria (el 60% de los casos en los que se ha conseguido aislar el agente). Las aves de corral y los productos derivados de ellos están reconocidos como el principal reservorio de *Salmonella*, y la más importante fuente de infección de *Salmonella Enteritidis* en humanos. La infección es una zoonosis que se transmite por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, y constituye actualmente una pandemia. Para controlar la salmonelosis, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Unión Europea han establecido unas pautas para la

monitorización y erradicación de la infección por *Salmonella Enteritidis* en aves de corral, ya que los beneficios para la población humana serían evidentes. En el control de *Salmonella* en aves de corral se han empleado antibióticos, la exclusión competitiva, la selección genética de las aves y las vacunas, así como la mejora de las condiciones higiénicas de las explotaciones avícolas. De ellas, está ampliamente aceptado que la medida más práctica sería la vacunación, por ser la más fácil de aplicar y la menos costosa. Aunque en la actualidad, se están utilizando vacunas vivas atenuadas y vacunas muertas (bacterinas), ambas son poco eficaces en granjas avícolas (gallinas y otras aves de corral) [Zhang-Barber *et al*, *Vaccine*, 17 (1999) 2538-2545]. Además de su poca eficacia, la gran desventaja de las vacunas vivas es su potencial virulencia en animales inmunodeprimidos, así como su posible reversibilidad a estados invasivos. Además, han de administrarse parenteralmente e interfieren con las tradicionales pruebas de diagnóstico serológico. Las bacterias inactivadas (bacterinas) no tienen riesgos de virulencia residual, pero no inducen una respuesta inmune celular, se requiere la administración de algún potente adyuvante y necesitan múltiples dosis de recuerdo. Una alternativa sería la utilización de vacunas subcelulares que sean capaces de estimular una adecuada respuesta inmune frente a la infección por *Salmonella Enteritidis*. Aunque se han descrito para éstas un elevado grado de protección a nivel experimental, al igual que las bacterinas, requieren múltiples dosis de recuerdo para obtener un aceptable grado de protección [Powell, *Pharm Res*, 13 (1996) 1777-1785]. Por otra parte, si se administran por vía oral sufren desnaturalización y degradación en el tracto gastrointestinal [Langer *et al*, *Adv Drug Deliv Rev*, 28 (1997) 97-119], por lo que este tipo de vacunas debe administrarse por vía parenteral, con los consiguientes impedimentos logísticos y económicos que ello supone. Con objeto de solucionar esos inconvenientes, se pueden encapsular antígenos de *Salmonella Enteritidis* en las nanopartículas de PVM/MA descritas previamente.

El alérgeno o antígeno presente en esta variante de la composición 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. Esta realización es útil para estimular selectivamente una respuesta Th2 en el sujeto. En otra realización particular, dicho alérgeno o antígeno está encapsulado en el interior de dichas nanopartículas de PVM/MA. Esta realización es útil para estimular una respuesta Th1 y Th2 balanceada, o bien con predominio de respuesta Th1.

Las nanopartículas de PVM/MA cargadas con un alérgeno o un antígeno pueden obtenerse fácilmente mediante un procedimiento similar al descrito en la solicitud de patente WO 02/069938. A modo ilustrativo, dichas nanopartículas cargadas con alérgeno o con antígeno se pueden preparar fácilmente por desolvatación con una fase líquida, por ejemplo, una fase hidroalcohólica, tal como una fase líquida formada por etanol y agua, de una solución de un copolímero de PVM/MA en un disolvente orgánico, tal como un disolvente orgánico polar, por ejemplo, acetona. Las nanopartículas formadas se dejan en una suspensión acuosa o se liofilizan. Dependiendo del momento en el que se añada el alérgeno o el antígeno se obtendrán distintas formulaciones con diferente disposición de los mismos (véanse las formulaciones identificadas como NP I, NP II, NP III, NP IV y NP HE 3934 en los Ejemplos 1 y 6). A modo ilustrativo, cuando se desea que el alérgeno o el antígeno se encuentre recubriendo la totalidad o parte de la superficie de las nanopartículas, entonces se incuba dicho alérgeno o dicho antígeno después de haber evaporado los disolventes orgánicos. Asimismo, cuando se desea que el alérgeno o el antígeno se encuentre encapsulado en el interior de dichas nanopartículas, entonces se incuba dicho alérgeno o dicho antígeno disperso en un disolvente, preferentemente el disolvente en el que se encuentra la solución del copolímero de PVM/MA o miscible con dicho disolvente, tal como un disolvente orgánico, preferentemente polar, o un disolvente miscible con el de la solución del polímero, por ejemplo, acetona, antes de añadir dicha fase líquida utilizada para desolvatar la solución del copolímero de PVM/MA. Opcionalmente, si se desea, se puede adicionar un agente reticulante tal como se ha mencionado previamente en relación con las nanopartículas vacías.

De forma más concreta, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de una composición de la invención que comprende nanopartículas a base de un copolímero de PVM/MA cargadas con un alérgeno o con un antígeno, en donde dichas nanopartículas a base de copolímero de PVM/MA comprenden un alérgeno o un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) desolvatación de una solución orgánica de un copolímero de PVM/MA disuelto en un disolvente orgánico con una solución hidroalcohólica;
- b) eliminación de los disolventes orgánicos para obtener nanopartículas, y
- c) adición de dicho alérgeno o de dicho antígeno a dicha solución orgánica de copolímero de PVM/MA antes de efectuar la desolvatación de dicha solución orgánica del copolímero de PVM/MA o, alternativamente, incubar dicho alérgeno o dicho antígeno con dichas nanopartículas obtenidas en la etapa b).

El disolvente orgánico en el que se disuelve el copolímero de PVM/MA puede ser cualquier disolvente en el que dicho copolímero sea soluble, típicamente, un disolvente polar, tal como una cetona, por ejemplo, acetona. La fase líquida utilizada para efectuar dicha desolvatación puede ser cualquier solución hidroalcohólica que comprende un alcohol y agua, por ejemplo, etanol y agua, por ejemplo, alcohol y agua de calidad farmacéutica (agua purificada o agua para inyectable, según la aplicación). Ventajosamente, la relación solución de copolímero: solución hidroalcohólica está comprendida entre 1:1 y 1:10, preferentemente 1:4. A continuación, los disolventes orgánicos se eliminan por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante evaporación a presión reducida y las nanopartículas se forman instantáneamente en el medio, bajo la apariencia de una suspensión lechosa acuosa estable.

ES 2 246 695 B1

La adición del alérgeno o del antígeno a la solución orgánica de copolímero de PVM/MA antes de efectuar la desolvatación de dicha solución orgánica del copolímero de PVM/MA permite obtener nanopartículas en las que el alérgeno o el antígeno está contenido en el interior de dichas nanopartículas. Ventajosamente, dicho alérgeno o antígeno se adiciona disuelto o disperso en el mismo disolvente orgánico que el de la solución orgánica del copolímero de PVM/MA o bien miscible con dicho disolvente, tal como un disolvente orgánico polar, por ejemplo, acetona. Alternativamente, la incubación de dicho alérgeno o de dicho antígeno con las nanopartículas obtenidas en la etapa b) permite obtener nanopartículas en las que el alérgeno o el antígeno está recubriendo la totalidad o parte de la superficie exterior de dichas nanopartículas. En una realización particular, la incubación del alérgeno o del antígeno con las nanopartículas se realiza en un medio acuoso.

Opcionalmente, si se desea, se puede añadir un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las nanopartículas, tal como se describe previamente en relación con las nanopartículas vacías.

Las nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno obtenidas se pueden purificar por medios convencionales, por ejemplo, mediante centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial, o evaporación, incluyendo la utilización de vacío.

Finalmente, si se desea, las nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno se pueden liofilizar para su almacenaje y conservación a largo plazo. Para facilitar la liofilización se pueden utilizar agentes crioprotectores habituales, preferentemente a una concentración comprendida entre el 0,1 y el 10% en peso respecto al total de la composición.

Las nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno pueden actuar como adyuvante en vacunación o en inmunoterapia y producen un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto, tal como se pone de manifiesto en los Ejemplos 3-6.

La dosis de nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno a administrar 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.

En otra variante de esta invención, la composición de la invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA cargadas con un agente inmunoestimulante, en donde dichas nanopartículas a base de PVM/MA comprenden un agente inmunoestimulante.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “agente inmunoestimulante” o “inmunomodulador” se refiere a un producto capaz de potenciar, de forma específica o inespecífica, la respuesta inmunitaria, por ejemplo, proteínas o péptidos que funcionan como adyuvantes naturales estimulando la respuesta del sistema inmunitario frente al alérgeno o al antígeno, lipopolisacáridos bacterianos, componentes de la pared celular de las bacterias Gram positivas (por ejemplo, muramil dipéptido (MDP)) secuencias CpG de ADN, extractos de plantas, principalmente saponinas, etc. Prácticamente cualquier agente inmunoestimulante puede ser utilizado en la elaboración de las nanopartículas cargadas con agente inmunoestimulante de la invención; no obstante, en una realización particular, dicho agente inmunoestimulante es el lipopolisacárido rugoso de *Brucella Ovis*.

Dicho agente inmunoestimulante 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 agente inmunoestimulante está recubriendo la totalidad o parte de dichas nanopartículas de PVM/MA, mientras que en otra realización particular, dicho agente inmunoestimulante está encapsulado en el interior de dichas nanopartículas de PVM/MA.

Las nanopartículas de PVM/MA cargadas con agente inmunoestimulante pueden obtenerse fácilmente mediante un procedimiento similar al descrito previamente en relación con la elaboración de nanopartículas de PVM/MA cargadas con un alérgeno o con un antígeno pero reemplazando dicho alérgeno o antígeno por el agente inmunoestimulante. De este modo, dependiendo del momento en el que se añada el agente inmunoestimulante, se obtendrán distintas formulaciones con diferente disposición del mismo (véase el Ejemplo 1 o 4). A modo ilustrativo, cuando se desea que el agente inmunoestimulante se encuentre recubriendo la totalidad o parte de la superficie de las nanopartículas, entonces se incuba dicho agente inmunoestimulante después de haber evaporado los disolventes orgánicos. Asimismo, cuando se desea que el agente inmunoestimulante se encuentre encapsulado en el interior de dichas nanopartículas, entonces se incuba dicho agente inmunoestimulante disperso o disuelto en un disolvente, ventajosamente el disolvente en el que se encuentra la solución del copolímero de PVM/MA o miscible con dicho disolvente, tal como un disolvente orgánico, preferentemente polar, o un disolvente miscible con el de la solución del polímero, por ejemplo, acetona, antes de añadir dicha fase líquida utilizada para desolvatar la solución del copolímero de PVM/MA. Opcionalmente, si se desea, se puede adicionar un agente reticulante tal como se ha mencionado previamente en relación con las nanopartículas vacías.

Opcionalmente, si se desea, se puede añadir un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las nanopartículas, tal como se describe previamente en relación con las nanopartículas vacías.

Las nanopartículas cargadas con agente inmunoestimulante se pueden purificar por medios convencionales tal como se ha mencionado previamente en relación con las nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno. Asimismo, si se desea, las nanopartículas cargadas con agente inmunoestimulante se pueden liofilizar utilizando para ello agentes

ES 2 246 695 B1

crioprotectores habituales, preferentemente a una concentración comprendida entre el 0,1 y el 10% en peso respecto al total de la composición.

5 Las nanopartículas cargadas con agente inmunoestimulante pueden actuar como adyuvante en vacunación o en inmunoterapia y producen un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

10 La dosis de nanopartículas cargadas con agente inmunoestimulante a administrar 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.

10 En otra variante de esta invención, la composición de la invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA cargadas con un alérgeno o un antígeno y con un agente inmunoestimulante, en donde dichas nanopartículas a base de PVM/MA comprenden un alérgeno o un antígeno y un agente inmunoestimulante.

15 El alérgeno o antígeno así como el agente estimulante presentes en esta variante de la composición de la invención pueden estar recubriendo, al menos, parcialmente la superficie de dichas nanopartículas y/o contenidos en el interior de dichas nanopartículas.

20 En una realización particular, dicho alérgeno o antígeno está recubriendo la totalidad o parte de la superficie de dichas nanopartículas mientras que el agente inmunoestimulante está contenido en el interior de dichas nanopartículas, habiéndose observado que esta realización particular permite estimular selectivamente una respuesta Th2 en el sujeto.

25 En otra realización particular, dicho alérgeno o antígeno está encapsulado en el interior de dichas nanopartículas de PVM/MA mientras que dicho agente estimulante está recubriendo, al menos, parcialmente la superficie de dichas nanopartículas. Esta realización es particularmente interesante para estimular una respuesta Th1 y Th2 balanceada, o bien con predominio de respuesta Th1.

30 En otra realización particular, tanto el alérgeno o antígeno como el agente inmunoestimulante están encapsulados en el interior de dichas nanopartículas de PVM/MA.

30 Las nanopartículas de PVM/MA que contienen un alérgeno o un antígeno y un agente inmunoestimulante pueden obtenerse fácilmente mediante un procedimiento similar a los descritos previamente. Dependiendo del momento en el que se añade el alérgeno o el antígeno y el agente inmunoestimulante, se obtendrán distintas formulaciones con diferente disposición de dichos productos. A modo ilustrativo, cuando se desea que el agente inmunoestimulante se encuentre recubriendo la totalidad o parte de la superficie de las nanopartículas, entonces se incubaba dicho agente inmunoestimulante después de haber evaporado los disolventes orgánicos. Asimismo, cuando se desea que el agente inmunoestimulante se encuentre encapsulado en el interior de dichas nanopartículas, entonces se incubaba dicho agente inmunoestimulante disperso o disuelto en un disolvente, ventajosamente el disolvente en el que se encuentra la solución del copolímero de PVM/MA o miscible con dicho disolvente, tal como un disolvente orgánico, preferentemente polar, o un disolvente miscible con el de la solución del polímero, por ejemplo, acetona, antes de añadir dicha fase líquida utilizada para desolvatar la solución del copolímero de PVM/MA. De forma similar, cuando se desea que el alérgeno o el antígeno se encuentre recubriendo la totalidad o parte de la superficie de las nanopartículas, entonces se incubaba dicho alérgeno o dicho antígeno después de haber evaporado los disolventes orgánicos. Asimismo, cuando se desea que el alérgeno o el antígeno se encuentre encapsulado en el interior de dichas nanopartículas, entonces se incubaba dicho alérgeno o antígeno disperso o disuelto en un disolvente, ventajosamente el disolvente en el que se encuentra la solución del copolímero de PVM/MA o miscible con dicho disolvente, tal como un disolvente orgánico, preferentemente polar, o un disolvente miscible con el de la solución del polímero, por ejemplo, acetona, antes de añadir dicha fase líquida utilizada para desolvatar la solución del copolímero de PVM/MA. Análogamente, cuando se desea que el alérgeno o el antígeno y el agente inmunoestimulante estén encapsulados en el interior de dichas nanopartículas, entonces se incubaba dicho alérgeno o dicho antígeno, opcionalmente mezclado con dicho agente inmunoestimulante, disperso o disuelto en un disolvente, ventajosamente el disolvente en el que se encuentra la solución del copolímero de PVM/MA o miscible con dicho disolvente, tal como un disolvente orgánico, preferentemente polar, o un disolvente miscible con el de la solución del polímero, por ejemplo, acetona, antes de añadir dicha fase líquida utilizada para desolvatar la solución del copolímero de PVM/MA. En cualquier caso, si se desea, se puede adicionar, opcionalmente, un agente reticulante a las nanopartículas obtenidas, para mejorar su estabilidad, tal como se describe previamente en relación con las nanopartículas vacías.

60 De forma más concreta, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de una composición de la invención que comprende nanopartículas a base de un copolímero de PVM/MA cargadas con un alérgeno o con un antígeno y con un agente inmunoestimulante, en donde dichas nanopartículas a base de copolímero de PVM/MA comprenden un alérgeno o un antígeno y un agente inmunoestimulante, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 65 a) desolvatación de una solución orgánica de un copolímero de PVM/MA disuelto en un disolvente orgánico con una solución hidroalcohólica;
- b) eliminación de los disolventes orgánicos para obtener nanopartículas, y

ES 2 246 695 B1

- c) adición de dicho alérgeno o de dicho antígeno y/o de dicho agente inmunoestimulante a dicha solución orgánica de copolímero de PVM/MA antes de efectuar la desolvatación de dicha solución orgánica del copolímero de PVM/MA o, alternativamente, incubar dicho alérgeno o dicho antígeno o dicho agente inmunoestimulante con dichas nanopartículas obtenidas en la etapa b).

5

Las etapas a) y b) se realizan de forma similar a como se ha descrito previamente en relación con el procedimiento para producir una composición de la invención que comprende nanopartículas a base de un copolímero de PVM/MA cargadas con un alérgeno o con un antígeno. La etapa c) se realiza de forma similar a como se ha descrito previamente en relación con dicho procedimiento pero efectuando las modificaciones debidas para adicionar el agente inmunoestimulante, bien a dicha solución orgánica de copolímero de PVM/MA antes de efectuar la desolvatación de dicha solución orgánica del copolímero de PVM/MA, opcionalmente junto con el alérgeno o el antígeno, o bien, alternativamente, incubando dicho agente inmunoestimulante con dichas nanopartículas obtenidas en la etapa b), opcionalmente recubiertas parcialmente con dicho alérgeno o antígeno, de acuerdo con lo mencionado más arriba.

10

15

Opcionalmente, si se desea, se puede añadir un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las nanopartículas obtenidas. Las nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno y con agente inmunoestimulante obtenidas se pueden purificar por medios convencionales, por ejemplo, mediante centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial, o evaporación, incluyendo la utilización de vacío.

20

Finalmente, si se desea, las nanopartículas cargadas con alérgeno o antígeno se pueden liofilizar para su almacenaje y conservación a largo plazo. Para facilitar la liofilización se pueden utilizar agentes crioprotectores habituales, preferentemente a una concentración comprendida entre el 0,1 y el 10% en peso respecto al total de la composición.

25

Las nanopartículas cargadas con un alérgeno o con un antígeno y con un agente inmunoestimulante pueden actuar como adyuvante en vacunación o en inmunoterapia y producen un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto, tal como se pone de manifiesto en los Ejemplos 3-6.

30

La dosis de nanopartículas cargadas con un alérgeno o un antígeno y con un agente inmunoestimulante a administrar 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.

35

La composición de la invención, si se desea, puede encontrarse en forma liofilizada o bien en una forma de administración adecuada para su administración por vía oral o parenteral. La liofilización se lleva a cabo por métodos convencionales, opcionalmente en presencia de agentes crioprotectores convencionales, por ejemplo, sacarosa, manitol, trehalosa, glicerol, lactosa, sorbitol, polivinilpirrolidona, etc., preferentemente a una concentración comprendida entre el 0,1 y el 10% en peso respecto al total de la composición. Para la elaboración de las distintas formas de administración adecuadas para su administración por vía oral o parenteral se utilizarán los excipientes y vehículos aceptables adecuados para la elaboración de la forma de administración deseada. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas de administración adecuadas para la administración de la composición de la invención por vía oral o parenteral puede encontrarse en tratados de farmacia galénica.

40

45

Tal como se ha mencionado previamente, la composición de la invención produce un efecto estimulador o potenciador de la respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto por lo que puede ser utilizada como adyuvante en vacunas o en inmunoterapia. De hecho, la composición de la invención tiene la capacidad de estimular selectivamente una de las dos vías de respuesta inmunitaria (Th1 o Th2) o bien ambas vías de forma simultánea y balanceada, por lo que puede utilizarse en formulaciones vacunales o inmunoterapéuticas dependiendo en función de la respuesta que se desee estimular. 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.) 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 general, para estimular una respuesta selectiva Th2, las formulaciones contendrán nanopartículas de PVM/MA recubiertas total o parcialmente por el alérgeno o el antígeno, mientras que para estimular una respuesta Th1 y Th2 de forma balanceada, o con predominio de la respuesta Th1, las formulaciones contendrán nanopartículas de PVM/MA en las que el antígeno o el alérgeno irá encapsulado y, ventajosamente, dichas nanopartículas incluirán un agente reticulante. En cualquiera de los casos mencionados previamente, las nanopartículas pueden incluir, si se desea, un agente inmunoestimulante.

50

55

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna o con una composición para inmunoterapia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria (composición de la invención) junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha vacuna o composición para inmunoterapia puede encontrarse en cualquier forma farmacéutica de administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, oral, parenteral, rectal, 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,

60

65

ES 2 246 695 B1

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.

La composición de la invención presente en dicha vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA. Dichas nanopartículas pueden contener, además, un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, los cuales pueden estar contenidos en el interior de dichas nanopartículas y/o recubriendo al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas. Asimismo, dichas nanopartículas pueden contener, opcionalmente, un agente reticulante.

En una realización particular, la composición de la invención presente en dicha vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención comprende nanopartículas a base de PVM/MA vacías que, opcionalmente, incorporan un agente reticulante. En este caso, la composición de la invención se administra en combinación con composiciones vacunales o inmunoterapéuticas que contienen un antígeno o un alérgeno, respectivamente, produciéndose un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria tras la administración de dicha composición vacunal o inmunoterapéutica y las nanopartículas vacías. 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.

En otra realización particular, la composición de la invención presente en dicha vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención comprende unas nanopartículas a base de PVM/MA en donde dichas nanopartículas de PVM/MA comprenden, además, un alérgeno o un antígeno, y, si se desea, un agente reticulante.

En otra realización particular, la composición de la invención presente en dicha vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención comprende unas nanopartículas a base de PVM/MA en donde dichas nanopartículas de PVM/MA comprenden, además, un agente inmunoestimulante, y, si se desea, un agente reticulante.

En otra realización particular, la composición de la invención presente en dicha vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención comprende unas nanopartículas a base de PVM/MA en donde dichas nanopartículas de PVM/MA comprenden, además, un alérgeno o un antígeno y un agente inmunoestimulante, y, si se desea, un agente reticulante.

La vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención comprende una composición de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para potenciar o estimular la respuesta inmunitaria. Por tanto, la cantidad de composición de la invención presente en una vacuna o composición para inmunoterapia proporcionada por esta invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otros factores, del tipo de nanopartículas (vacías o cargadas con alérgeno o antígenos y/o con agente inmunoestimulante), etc. No obstante, en una realización particular, la invención proporciona una vacuna o composición para inmunoterapia que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso respecto al total</u>
Nanopartículas de PVM/MA	84-99,998%
Agente reticulante	0,001-1%
Alérgeno o antígeno	0,001-15%

Opcionalmente, dicha vacuna o composición para inmunoterapia puede contener agente crioprotector en cantidad suficiente para proteger a las nanopartículas durante el proceso de liofilización.

En una realización particular, dicho alérgeno comprende un extracto alérgico de polen, un extracto alérgico de un insecto o un extracto alérgico de un producto alimenticio.

En otra realización particular, dicho antígeno comprende un extracto inmunogénico procedente de un organismo, por ejemplo, un extracto de membrana de *Salmonella spp.*

Como se ha mencionado previamente, la composición de la invención tiene la capacidad de producir un efecto estimulador o potenciador de la respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto, por lo que puede ser utilizada como adyuvante en vacunas o en inmunoterapia, y, de forma más concreta, de estimular selectivamente una de las dos vías de respuesta inmunitaria (Th1 o Th2) o bien ambas vías de forma simultánea y balanceada.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una composición de la invención en la elaboración de una vacuna o composición para inmunoterapia.

ES 2 246 695 B1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una composición de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación o potenciación selectiva o predominante de la respuesta inmunitaria Th1.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una composición de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación o potenciación selectiva o predominante de la respuesta inmunitaria Th2.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una composición de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación o potenciación, de forma balanceada, de las respuestas inmunitarias Th1 y Th2.

El empleo de la composición de la invención para vacunación e inmunoterapia presenta numerosas ventajas, ya que comprende:

- 15 - la utilización de formas farmacéuticas biodegradables, en las condiciones normales del organismo, y fabricadas a partir de polímeros y materiales aceptados en la práctica farmacéutica y médica;
- 20 - la administración de un preparado para inmunoterapia y vacunación, a base de nanopartículas, que protege el alérgeno o antígeno encapsulado contra su inactivación prematura;
- 25 - la elaboración de un preparado para inmunoterapia y vacunación, basado en la utilización de nanopartículas, que presenta una liberación sostenida en el tiempo; el periodo de tiempo durante el cual se producirá la liberación controlada dependerá de las condiciones del microentorno propias al lugar de administración;
- 30 - la administración de un adyuvante nanoparticulado, a base de nanopartículas, dadas sus características (inocuidad, biodegradabilidad, avirulencia) puede ser susceptible de utilización en humanos y animales para fines de inmunoterapia y vacunación por diferentes vías de administración; y
- la administración de un adyuvante nanoparticulado, a base de nanopartículas que, dado su potencial bioadhesivo en el tracto gastrointestinal, hace que sea posible la vía oral como ruta de administración.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos de la misma.

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen la producción de distintos tipos de nanopartículas a base de PVM/MA que, opcionalmente, contienen un alérgeno o un antígeno y/o un agente inmunoestimulante, y ponen de manifiesto la capacidad de dichas nanopartículas de actuar como adyuvante en inmunoterapia o vacuna.

40 *Procedimiento general de producción de nanopartículas*

El procedimiento general de producción de las nanopartículas de PVM/MA comprende la disolución de dicho copolímero en acetona seguido de la adición de etanol. A la solución resultante se le añade un volumen similar de agua con lo que se forman instantáneamente en el medio las nanopartículas, bajo la apariencia de una suspensión lechosa. A continuación, se retiran los disolventes orgánicos (etanol y acetona) mediante evaporación bajo presión reducida, quedando las partículas en una suspensión acuosa estable [Arbos *et al*, *J Control Rel*, 83 (2002) 321-330]. Dependiendo del momento en el que se añadan los alérgenos o antígenos y, en su caso, el agente inmunoestimulante, se obtendrán distintas formulaciones con diferente disposición de los mismos (véanse los Ejemplos 1, 5 y 6). A modo ilustrativo:

- 55 A. Para obtener formulaciones que contienen el alérgeno o el antígeno encapsulado en el interior de las nanopartículas (formulaciones NP I y NP VI): la incubación con el alérgeno o antígeno a encapsular se lleva a cabo tras haber evaporado los disolventes orgánicos.
- B. Para obtener formulaciones que contienen el alérgeno o el antígeno recubriendo total o parcialmente la superficie exterior de las nanopartículas (formulaciones NP II, NP III, NP IV, NP V, NP VII, OVASAL y NP HE): se incuba el alérgeno o antígeno disperso en acetona antes de añadir el etanol y el agua.

60 El siguiente paso consiste en la adición del agente reticulante que, en este caso, ha sido el 1,3-diaminopropano, a las formulaciones NP III, NP V, NP VII, OVASAL, NP HE (5 µg/mg polímero en todas ellas) y NP IV (10 µg/mg polímero).

65 Las formulaciones NP-V, NP-VI y NP-VII contienen un agente inmunoestimulante consistente en el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de *Brucilla Ovis*. Brevemente, para su incorporación, en el caso de la formulación NP V, la incubación con dicho agente inmunoestimulante se lleva a cabo tras haber evaporado los disolventes orgánicos, mientras que en el caso de las formulaciones NP VI y NP VII se incuba el LPS-R antes de añadir el etanol y el agua (véanse los Ejemplos 1.4.2, 1.4.3 y 1.4.4).

ES 2 246 695 B1

La purificación de las nanopartículas se lleva a cabo mediante ultracentrifugación. Finalmente, las nanopartículas purificadas se liofilizan para su almacenaje 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).

El contenido proteico (principio activo) encapsulado se determinó mediante el ensayo con ácido microbicinónico (Micro BCA, Pierce, EEUU).

El lipopolisacárido rugoso de *Brucella Ovis* (LPS-R) adsorbido o encapsulado en las nanopartículas se cuantificó indirectamente midiendo uno de sus marcadores exclusivos, el KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico), por el método del ácido tiobarbitúrico [Warren, J Biol Chem, 243 (1959) 1971-1975].

Determinación de anticuerpos anti-OVA, citoquinas e IL-10

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 por pocillo a 4°C durante 15 horas; posteriormente se hicieron 5 lavados de 1 minuto en un lavador de ELISAs (Thermo LabSystems, Vantaa, Finlandia), se añadieron los sueros en diluciones seriadas partiendo de 1:40, se incubaron a 37°C durante 4 horas y se realizaron posteriormente 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, Vantaa, Finlandia) tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Las citoquinas (IFN-γ, IL-4) se analizaron mediante kits de ELISA (Biosource, EEUU) en los sobrenadantes procedentes de la reestimulación de las células esplénicas, de los ratones inmunizados previamente.

La IL-10 se analizó en los sueros procedentes de la sangre previamente centrifugada a 800 x g durante 10 minutos, mediante un kit de ELISA (Biosource, EEUU).

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

El perfil proteico de las muestras se determinó mediante SDS-PAGE [Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680-685], a una concentración del 15% de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1 (Biorad), en Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) y SDS 0,1% en el gel. El búfer de electrodo empleado contenía Tris-HCl 30 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1%. La muestra se trató a 100°C durante 10 minutos en Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,002%. La electroforesis se realizó en geles de 8x7 cm con una intensidad constante de 15 mA/gel. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie [King, *Anal Biochem*, 71 (1976) 223-230]. Para ello, se incubaron en ácido tricloroacético al 3% en agua durante 1 hora para su fijación. La tinción se realizó con una solución de Azul de Coomassie al 0,25% en metanol 50% y ácido acético 10% durante 1 h y se decoloró en metanol 50% y ácido acético 20% hasta que las muestras se hicieron visibles. Los pesos moleculares aparentes de los componentes de las muestras se determinaron comparando su movilidad electroforética con un marcador estándar de pesos moleculares (Rainbow, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que contiene miosina (220 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhídrido carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Inmunoblotting

El inmunoblotting se realizó según un protocolo descrito anteriormente [Towbin & Staehelin, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 (1979) 4350-4354]. Brevemente, tras someter las muestras a SDS-PAGE, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). La transferencia se realizó empleando el método semiseco mediante el sistema Trans-Blot® SD, Semy-Dry transfer Cell (Bio-Rad, Richmond, EEUU) a 200 mA, 5 V durante 30 minutos, en un búfer de transferencia de Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y metanol 10%.

Ejemplo 1

Inmunoterapia

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

La proteína elegida fue la ovoalbúmina (OVA) por ser actualmente ampliamente utilizada como modelo alergénico experimental.

ES 2 246 695 B1

La ovoalbúmina representa más del 50% del contenido proteico de la clara del huevo. Es una fosfoglicoproteína monomérica que consta de 385 aminoácidos, con un peso molecular de 43 a 45 kDa [Johnsen y Elsayed, *Mol Immunol*, 27 (1990) 821]. La ovoalbúmina es la proteína del huevo que tiene mayor capacidad alergénica induciendo una hipersensibilidad inmediata tipo I, mediada por IgE.

El proceso que se describe a continuación es válido para la preparación de formas farmacéuticas coloidales de tipo nanopartícula que pueden ser utilizadas para inmunoterapia.

1.1 Preparación de nanopartículas vacías (NP)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] se disuelven en 5 mL de acetona. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 10 mL.

La solución se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

Las nanopartículas vacías (NP) obtenidas tienen un tamaño medio inferior a los 200 nm y una carga neta superficial de -45,1 mV (ver Tabla 1).

1.2 Preparación de nanopartículas recubiertas de ovoalbúmina (NP I)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] se disuelven en 5 mL de acetona. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 5 mL. Esta solución se incuba con 5 mL de una solución acuosa de ovoalbúmina que contenga 10 mg de proteína, durante 1 hora a temperatura ambiente.

La mezcla se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

Las nanopartículas obtenidas (NP I) tienen un tamaño medio inferior a los 300 nm, una carga neta superficial de -61,3 mV y un contenido de ovoalbúmina de 54,7 µg/mg de polímero (ver Tabla 1).

1.3 Preparación de nanopartículas con ovoalbúmina encapsulada (NP II, NP III y NP IV)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] se disuelven en 4 mL de acetona, mientras que por otra parte se dispersan 5 mg de ovoalbúmina en 1 mL de acetona por ultrasonificación (Microson™) o baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento. La dispersión de ovoalbúmina se añade a la suspensión del polímero y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 10 mL. Las nanopartículas obtenidas tienen OVA encapsulada (NP II). En el caso de las formulaciones NP III y NP IV se añadiría ahora el agente reticulante: 0,05 mL y 0,1 mL de una solución de 1,3-diaminopropano al 1% respectivamente.

La mezcla se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

Las nanopartículas obtenidas tienen un tamaño medio inferior a los 300 nm, una carga neta superficial de -41,4 mV en el caso de las NP-II, -50,8 mV en NP-III y -57,5 mV en NP IV, y un contenido de ovoalbúmina cercano a 30 µg/mg de polímero (ver Tabla 1).

1.4 Preparación de nanopartículas con ovoalbúmina y lipopolisacárido rugoso de *Brucella Ovis* (NP V, NP VI y NP VII)

1.4.1 Extracción y caracterización del complejo lipopolisacárido rugoso de *Brucella Ovis*

El extracto utilizado es lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de *Brucella Ovis*. El LPS-R se obtuvo por un método descrito previamente (Galanos *et al*, Eur. J. Biochem. (1969), 245-249). Tras el cultivo de la bacteria, *Brucella Ovis*, se resuspenden en etanol absoluto agitando a 4°C durante una noche en un recipiente cerrado. A continuación, se centrifugan las células (6.000 x g, 20 minutos, 4°C) y se resuspenden en acetona agitando 12 h a 4°C en un recipiente

ES 2 246 695 B1

cerrado. Posteriormente, se recuperan las células por centrifugación (6.000 x g, 20 minutos, 4°C), se resuspenden en éter etílico y se mantienen a temperatura ambiente de 3 a 4 horas con agitación magnética. A continuación, se centrifugan de nuevo (6.000 x g, 20 minutos, 4°C) y se evaporan a sequedad. Para proceder a la extracción se mezclan las células hasta homogeneización con éter de petróleo-cloroformo-fenol en proporción 8:5:2 respectivamente. La
5 mezcla se centrifuga (8.000 x g, 15 minutos, temperatura ambiente) y se recoge el sobrenadante. El sedimento se re-extrae en las mismas condiciones dos veces más. Se reúnen todos los sobrenadantes y se evapora el éter de petróleo y el cloroformo en un rotavapor. El residuo fenólico se precipita con agua destilada y se centrifuga (8.000 x g, 30 minutos, temperatura ambiente). A continuación se lava dos veces más con fenol y otras tres veces con éter etílico. Tras la
10 última centrifugación se eliminan los restos de éter etílico a vacío, se resuspende el sedimento en agua desionizada y se dializa. Por último se centrifuga el contenido de la tripa de diálisis (100.000 x g, 6 horas, 4°C), se resuspende el sedimento en agua desionizada y se liofiliza.

La cantidad de LPS-R se determina indirectamente midiendo uno de sus marcadores exclusivos, el KDO, por el método del ácido tiobarbitúrico.

1.4.2 Nanopartículas con ovoalbúmina encapsulada y LPS-R de *Brucella Ovis* en la superficie (NP V)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico [Gantrez® AN 119] se disuelven en 4 mL de acetona, mientras que por otra parte se dispersan 5 mg de ovoalbúmina en 1 mL de acetona por ultrasonificación (Microson™) o baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento. La dispersión de ovoalbúmina se añade a la suspensión del copolímero y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos
20 disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 9 mL. Esta solución se incuba con 1 mL de una dispersión acuosa (previamente ultrasonificada durante un minuto) que contiene 1 mg de LPS-R de *Brucella Ovis* durante 1 hora a temperatura ambiente.

La mezcla se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

Las nanopartículas obtenidas (NP V) tienen un tamaño medio inferior a los 300 nm, una carga neta superficial de -46,1 mV, un contenido de ovoalbúmina de 64,1 µg/mg de polímero y 15,2 µg de LPS-R/mg de polímero (ver Tabla 1).

1.4.3 Nanopartículas con LPS-R de *Brucella Ovis* encapsulado y ovoalbúmina en la superficie (NP VI)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico [Gantrez® AN 119] se disuelven en 4 mL de acetona, mientras que por otra parte se dispersa 1 mg de LPS-R de *Brucella Ovis* en 1 mL de acetona por ultrasonificación (Microson™) o baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento. La dispersión de LPS-R se añade a la suspensión del copolímero y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta
40 eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 5 mL. Esta solución se incuba con 5 mL de una solución acuosa que contenga 5 mg de de ovoalbúmina durante 1 hora a temperatura ambiente.

La mezcla se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

Las nanopartículas obtenidas (NP VI) tienen un tamaño medio inferior a los 300 nm y una carga neta superficial de -56,9 mV, un contenido de ovoalbúmina de 68,5 µg/mg de polímero y 12,1 µg de LPS-R/mg de polímero (ver Tabla 1).

1.4.4 Nanopartículas con ovoalbúmina y LPS-R de *Brucella Ovis* encapsulados (NP VII)

100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico [Gantrez® AN 119] se disuelven en 3 mL de acetona, mientras que por otra parte se dispersan 5 mg de ovoalbúmina en 1 mL de acetona por ultrasonificación (Microson™) o baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento, y 1 mg de LPS-R de *Brucella Ovis* en 1 mL de acetona, también por ultrasonificación bajo enfriamiento. La dispersión de ovoalbúmina se añade a la dispersión del LPS-R, y esta mezcla a la suspensión del copolímero y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 10 mL.

La mezcla se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en agua o en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

ES 2 246 695 B1

Las nanopartículas obtenidas (NP VII) tienen un tamaño medio inferior a los 300 nm y una carga neta superficial de -46,1 mV, un contenido de ovoalbúmina de 54,7 µg/mg de polímero y 13,8 µg de LPS-R/mg de polímero (ver Tabla 1).

5 1.5 Caracterización de las nanopartículas

La caracterización físico-química de las distintas formulaciones se recoge en la Tabla 1.

Según los resultados que se recogieron se observó que al estar las nanopartículas recubiertas por ovoalbúmina (NP I y NP VI) el tamaño aumenta y el potencial zeta se hace más negativo, mientras que si la ovoalbúmina está mayoritariamente en el interior de las nanopartículas (NP II, NP III, NP IV, NP V y NP VII), el tamaño, al igual que el potencial zeta, no varía tanto en comparación con las nanopartículas vacías (NP).

Por otra parte se pudo observar que los tamaños de las nanopartículas aumentaban a medida que aumentaba la cantidad de agente reticulante añadido, y la cantidad de ovoalbúmina disminuía ligeramente.

La presencia de LPS-R en la superficie de las nanopartículas hace que aumente la cantidad de ovoalbúmina encapsulada (NP V vs NP II), mientras que si el LPS-R está en mayoritariamente en el interior, la cantidad de ovoalbúmina adsorbida no varía (NP VI vs NP I).

TABLA 1

Caracterización físico-química de las distintas formulaciones (con datos expresados en media \pm desviación típica, $n=10$)

	Tamaño (nm)	Potencial Zeta (mV)	OVA encapsulada (µg/mg)	Eficacia de encapsulación (%)	R-LPS (µg/mg)
NP	158 \pm 3	-45,1 \pm 0,5	—	—	—
NP-I	300 \pm 4	-61,3 \pm 3,8	67,8 \pm 20,2	47,50 \pm 2,12	—
NP-II	205 \pm 1	-41,4 \pm 2,5	36,1 \pm 3,8	50,48 \pm 5,32	—
NP-III	239 \pm 4	-50,8 \pm 2,9	30,1 \pm 4,5	42,14 \pm 6,30	—
NP-IV	270 \pm 2	-57,5 \pm 3,1	31,4 \pm 4,2	44,08 \pm 5,88	—
NP-V	152	-46,1	64,1 \pm 2,9	89,74 \pm 4,06	15,2 \pm 0,5
NPVI	287	-56,9	68,5 \pm 2,4	47,95 \pm 1,68	12,1 \pm 0,6
NP-VII	135	-43,7	54,7 \pm 1,9	76,58 \pm 2,66	13,8 \pm 3,0

El rendimiento de fabricación de las nanopartículas fue del 70% aproximadamente.

Ejemplo 2

Ensayo de liberación *in vitro* de ovoalbúmina desde las nanopartículas

Para evaluar la liberación de ovoalbúmina *in vitro*, las nanopartículas se incubaron en 1 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4), en tubos "eppendorf" a una concentración aproximada de 8 mg/mL. Se incubaron los tubos en una estufa a 37°C con rotación y a intervalos de tiempo predeterminados se centrifugaron las muestras a 26.500 x g durante 20 minutos, recogiendo el sobrenadante para su posterior análisis. La ovoalbúmina liberada se midió en el sobrenadante por el método del ácido bicinónico.

La curva de liberación de ovoalbúmina obtenida se muestra en la Figura 1; se observa que en la formulación NP I la ovoalbúmina se libera más rápidamente que en las formulaciones NP II, NP III y NP IV, que presentan un perfil de liberación similar. Esto se debe a que en la formulación NP I la ovoalbúmina está adsorbida en el exterior de las nanopartículas, con lo que la liberación inicial ("burst") que presenta es mucho más marcado que en el resto de las

ES 2 246 695 B1

formulaciones, en las que parte de la ovoalbúmina está encapsulada (NP II, III y IV). Por otra parte se puede ver en los perfiles de liberación de NP II, NP III y NP IV que, a medida que aumenta la cantidad de agente reticulante, disminuye ligeramente el porcentaje de ovoalbúmina liberada.

5 Ejemplo 3

Cuantificación de la producción de anticuerpos anti-OVA tras inmunización con ovoalbúmina en ratones BALB/c

Se inmunizaron 65 ratones BALB/c dividiéndolos en 13 grupos según su pauta de administración.

Los controles utilizados fueron solución de ovoalbúmina (OVA) libre (10 μg vía intradérmica y 25 μg vía oral), nanopartículas vacías (NP) (vía intradérmica y vía oral) y ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum) (10 μg vía intradérmica), como control positivo inductor de respuesta Th2, caracterizada por títulos elevados de IgG₁ [Faquim-Mauro *et al*, *Int Immunol*, 12 (2000) 1733-1740].

El resto de grupos fueron inoculados vía intradérmica (10 μg OVA) ó vía oral (25 μg OVA), siendo los distintos tratamientos:

- a) Solución de Ovoalbúmina (OVA) vía intradérmica
- b) Solución de Ovoalbúmina (OVA) vía oral
- c) Ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum) vía intradérmica
- d) Nanopartículas vacías (NP) vía intradérmica
- e) Nanopartículas vacías (NP) vía oral
- f) Nanopartículas recubiertas de ovoalbúmina (NP I) vía intradérmica
- g) Nanopartículas recubiertas de ovoalbúmina (NP I) vía oral
- h) Nanopartículas con ovoalbúmina encapsulada (NP II) vía intradérmica
- i) Nanopartículas con ovoalbúmina encapsulada (NP II) vía oral
- j) Nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina encapsulada (NP III y NP IV) vía intradérmica
- k) Nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina encapsulada (NP III y NP IV) vía oral

Se realizaron sucesivas extracciones de sangre en los días 7, 14, 28 y 35 tras la inmunización. Se hizo un pool de los sueros de cada grupo y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

Se determinaron los niveles de anticuerpos anti-OVA (IgG₁ e IgG_{2a}) en los distintos sueros mediante ELISA y se obtuvieron los datos que se recogen en las Figura 2 y 3. Se observó que las nanopartículas que contenían ovoalbúmina (NP I, NP II, NP III y NP IV) bien recubriendo las nanopartículas o bien encapsulada incrementaban la respuesta inmune respecto de la ovoalbúmina en solución. A día 14 tras la administración, dichas formulaciones de nanopartículas son capaces de aumentar en 3 ó 6 unidades logarítmicas, según el tipo, el título de IgG₁ en los sueros de los ratones. Por otra parte, los ratones administrados con OVA-Alum tuvieron ausencia de anticuerpos IgG_{2a} en suero a lo largo de todo el experimento, mientras que los ratones administrados con NP III llegaron a presentar un título de 5120 en el día 35 tras la inmunización.

Esto indica que, en general, dichas formulaciones de NP (NP I, NP II, NP III y NP IV) son capaces de amplificar los títulos de anticuerpos característicos tanto de Th1 como de Th2 pero, en particular, la formulación NP III es la más inmunogénica.

Por otra parte, si se comparan los títulos de los ratones del grupo de NP III con los del grupo de NP IV, se puede observar que existe un óptimo de reticulación (Ejemplo 2, último párrafo), ya que aunque presentan curvas similares de IgG₁, los títulos de IgG_{2a} para NP III son ligeramente mayores que en el caso de NP IV.

En cuanto a los resultados obtenidos en los ratones administrados por vía oral, se observó que la única formulación que indujo niveles cuantificables de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a} fue NP III (Figura 3).

Tras comprobar que, en estas condiciones experimentales, la formulación NP III fue la más eficaz, se hizo un estudio similar modificando las dosis de administración de NP III. En este caso se administraron (vía oral) a los animales las siguientes formulaciones:

ES 2 246 695 B1

- a) Nanopartículas vacías (NP)
- b) 25 μg de ovoalbúmina encapsulada con nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina encapsulada (NP III-25)
- c) 50 μg de ovoalbúmina encapsulada con nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina encapsulada (NP III-50)

En este caso, los resultados obtenidos (Figura 4) muestran que los niveles de IgG_{2a} anti-OVA en suero eran significativamente mayores cuando la dosis era de 50 μg .

Ejemplo 4

Cuantificación de la producción de anticuerpos anti-OVA e interleuquina 10 (IL-10) tras administración de nanopartículas de ovoalbúmina con lipopolisacárido de Brucella Ovis

Se inmunizaron 40 ratones BALB/c dividiéndolos en 8 grupos según su pauta de administración. A todos los grupos se les administró el tratamiento vía intradérmica (10 μg de ovoalbúmina). En esta ocasión los distintos tratamientos fueron:

- a) Solución de Ovoalbúmina (OVA)
- b) Ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum)
- c) Nanopartículas vacías (NP)
- d) Nanopartículas recubiertas de ovoalbúmina (NP I)
- e) Nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina encapsulada (NP III)
- f) Nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina encapsulada y recubiertas por LPS-R de *Brucella Ovis* (NP V)
- g) Nanopartículas con LPS-R de *Brucella Ovis* encapsulado y recubiertas por ovoalbúmina (NP VI)
- h) Nanopartículas reticuladas con 1,3-diaminopropano con ovoalbúmina y LPS-R de *Brucella Ovis* encapsulado (NP VII)

Como control positivo del experimento se tomó al grupo que se les había administrado ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel por vía intradérmica (OVA-Alum).

Se realizaron sucesivas extracciones de sangre en los días 7, 14, 28, 35, 42 y 49 tras la inmunización. Se procesaron las muestras (ver Ejemplo 3) y se obtuvieron los resultados que se recogen en las Figuras 5 y 6.

Respuesta IgG₁ (Figura 5): Tanto NP III como NP V y NP VII indujeron altos niveles de IgG₁ de manera mucho más rápida e intensa que la formulación control (OVA-Alum). Únicamente 49 días después de la administración, las formulaciones a base de nanopartículas y el control (OVA-Alum) muestran niveles similares. Por último, el LPS-R en la superficie de las nanopartículas no parece tener influencia en la inducción de niveles de IgG₁.

Por otra parte, NP I también muestra un fuerte potencial para inducir la producción de anticuerpos IgG₁. Además, como en el caso anterior, este fenómeno es más rápido e intenso que en la formulación control. Cuando se asocia LPS-R en el interior de nanopartículas recubiertas con OVA, sí se observa una reducción significativa en el título de IgG₁ en suero respecto a las formulaciones NP I y control.

Respuesta IgG_{2a}: La Figura 6 muestra los títulos de IgG_{2a} obtenidos en los sueros de los ratones. En este caso ninguna de las formulaciones control (OVA, NP, OVA-Alum) induce títulos de anticuerpos. Sin embargo, las formulaciones con OVA encapsulada fueron capaces de proporcionar títulos elevados de IgG_{2a}, principalmente cuando LPS-R estaba adsorbido en el exterior de las nanopartículas (formulación NP V). Por otra parte NP I se reveló mucho más efectiva que NP VI para inducir una respuesta Th1 medida en título de IgG_{2a} en suero.

IL-10: La Figura 7 muestra los niveles de IL-10 en suero, que se determinaron mediante un kit de ELISA (Biosource, Camarillo, USA). En este caso, tampoco fueron capaces los controles de inducir la secreción de IL-10 en suero. Sin embargo, todas las formulaciones de nanopartículas, en mayor o menor medida, indujeron la secreción de esta citoquina. La formulación con ovoalbúmina adsorbida en la superficie de NP (NP I) permitía la inducción de un pico de IL-10 de forma más rápida que el resto de formulaciones. Sin embargo, la asociación de LPS (NP VI) retrasaba significativamente (14 días) la secreción de la citoquina. Por otra parte, NP III se reveló como la formulación más eficaz para inducir IL-10 en suero, dando lugar a niveles dos veces mayores que para NP I, aunque retrasados en el tiempo

ES 2 246 695 B1

una semana. La asociación de LPS-R en nanopartículas encapsulando OVA (NP V y NP VII) permitía la inducción de niveles de IL-10 más discretos pero con un máximo a las dos semanas tras la administración. Esta potencialidad de las formulaciones para inducir niveles de IL-10 significativos sugiere su empleo como posibles tratamientos de enfermedades caracterizadas por desequilibrios en el balance Th1/Th2, debido al poder regulador de esta citoquina [Zuany-Amorim *et al.*, *J Clin Invest*, 95 (1995) 2644-2651; Stampfli *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21 (1999) 586-596; Hall *et al.*, *Vaccine*, 21 (2003) 549-561].

Ejemplo 5

10 *Preparación, caracterización y administración de nanopartículas con el extracto ChE de Salmonella Enteritidis*

5.1 Extracción del extracto ChE de Salmonella Enteritidis

15 El extracto bacteriano ChE (*chaotropic extract*) se obtuvo siguiendo un protocolo previamente descrito por Altman y colaboradores (Altman *et al.*, *Biochem J.* (1982) 505-513). Inóculos de *Salmonella Enteritidis* en estado estacionario se incubaron en frascos conteniendo 400 mL de medio BHI (Brain Heart Infusion, Difco Lab., Detroit, USA), a 37°C, 48 h, sin agitación. Posteriormente, las células se centrifugaron (7.000 x g, 30 minutos) y se lavaron con PBS (tampón fosfato salino; 10 mM; pH 7,4). El extracto bacteriano se obtuvo después del tratamiento del sedimento celular en KSCN/PBS 3M con agitación magnética (1h, temperatura ambiente), y posterior centrifugación (35.000 x 20 g, 30 minutos). El sobrenadante, conteniendo el extracto ChE, se recogió y dializó en primer lugar frente a PBS y posteriormente frente a agua desionizada. Finalmente se liofilizó y se conservó a 4°C hasta su posterior utilización.

5.2 Preparación de las nanopartículas con ovoalbúmina y ChE de Salmonella Enteritidis (OVASAL)

25 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico [Gantrez® AN 119] se disuelven en 3 mL de acetona, mientras que por otra parte se dispersan 5 mg de ovoalbúmina y 5 mg del extracto ChE en 2 mL de acetona por ultrasonificación (Microson™) durante 1 minuto bajo enfriamiento. La dispersión de ovoalbúmina y ChE se añade a la suspensión del polímero y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética, se adicionan 10 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se deja 30 homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 10 mL. A continuación se incuban con 0,1 mL de una solución de 1,3-diaminopropano al 1%.

35 La mezcla se somete a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en una solución acuosa de sacarosa al 5%. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes es liofilizada.

5.3 Cuantificación de la producción de anticuerpos anti-OVA tras inmunización con OVASAL en ratones BALB/c

40 Se inmunizaron con 10 µg de ovoalbúmina por vía intradérmica 15 ratones y se dividieron en 3 grupos distintos según el tratamiento recibido:

a) Solución de ovoalbúmina (OVA)

45 b) Ovoalbúmina adsorbida en alhidrogel (OVA-Alum)

c) Nanopartículas de ovoalbúmina y ChE de *Salmonella Enteritidis* (OVASAL)

50 Tras la administración de las distintas formulaciones se extrajo sangre del plexo retroorbital los días 7, 14, 28, 35, 42 y 49, y se procesaron las muestras como se indica en el Ejemplo 3. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. Sorprendentemente, OVASAL aumentaba considerablemente el título de IgG₁, mientras que el título de IgG_{2a} permanecía en niveles muy bajos. Esto indica que esta formulación es capaz de potenciar únicamente la respuesta Th2, la cual, además, era mucho más rápida e intensa que para la formulación control (OVA-Alum). Estos resultados 55 llevan a pensar en la probable aplicación como adyuvante en vacunas donde interese obtener niveles altos de anticuerpos o frente a toxinas secretadas por microorganismos. Igualmente, podría tener aplicación en ciertas enfermedades autoinmunes caracterizadas por presentar una respuesta Th1 descompensadamente elevada en fases agudas.

Ejemplo 6

60 *Preparación y caracterización de nanopartículas biodegradables con el extracto HE de Salmonella Enteritidis (NP HE 3934)*

6.1 Extracción y caracterización del complejo antigénico HE de Salmonella Enteritidis 3934

65 El antígeno utilizado es un extracto superficial de *S. Enteritidis* denominado HE (Hot saline Extract) debido a que en medio salino y con calor libera el complejo antigénico. Este HE contiene fosfolípidos, proteínas de superficie y lipopolisacárido liso (LPS-S). El extracto HE se obtuvo por un método descrito previamente [Gamazo *et al.*, *Infect. Immun.* (1989) 1419-1426]. Tras el cultivo de la bacteria, *Salmonella Enteritidis* 3934, en matraces conteniendo

ES 2 246 695 B1

tripticasa de soja (TSB), las bacterias se centrifugan a 7.000 x g durante 30 minutos y se lavan dos veces con solución salina. Las células vivas se resuspenden en solución salina (10 g de células en húmedo en 100 mL) y se calienta a 100°C en vapor fluyente durante 15 minutos. Tras su centrifugación (12.000 x g, 10 min.), el sobrenadante se dializa durante 5 días frente a varios cambios con agua desionizada. El material dializado se ultracentrifuga durante 4 horas a 60.000 x g, y el sedimento (HE) se resuspende en agua desionizada, se liofiliza y se almacena a temperatura ambiente.

La caracterización incluye la determinación del porcentaje de proteínas y de lipopolisacárido. La determinación de la cantidad de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry. El extracto antigénico de *Salmonella Enteritidis* 3934 contiene aproximadamente un 31% de proteínas. La cantidad de LPS se determina indirectamente midiendo uno de sus marcadores exclusivos, el KDO, por el método del ácido tiobarbitúrico. Por este método se obtuvo un 0,86% de KDO que representa un 65% de LPS-S.

6.2 Fabricación y caracterización físico-química de las nanopartículas con el extracto HE de *Salmonella Enteritidis* 3934 (NP HE 3934)

En primer lugar, 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico se disuelven en 5 mL de acetona; a esta solución se le añade el extracto antigénico HE (4 mg) también resuspendido en 1 mL de acetona y se mezcla bajo agitación magnética. Esta solución se deja incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden sobre esta fase 10 mL de etanol y finalmente el mismo volumen de agua. La mezcla resultante se deja homogeneizar durante 5 minutos. Entonces la suspensión de nanopartículas es evaporada bajo presión reducida hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajusta con agua a 10 mL.

La suspensión se somete a purificación por ultracentrifugación (10 minutos a 35.000 x g). Los sobrenadantes se eliminan y el residuo se resuspende en una solución acuosa de sacarosa al 5% p/v. Finalmente, la suspensión de nanopartículas resultantes se liofiliza, permitiendo mantener todas sus propiedades intactas.

La fórmula resultante de la suspensión de nanopartículas antes de liofilizar es:

Copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (Gantrez® AN-119)	1,0% p/v
Extracto antigénico	0,4% p/v
Sacarosa	5,0% p/v
Agua p.i.	c.s.p 10 mL

[p.i.: para inyección; c.s.p.: cantidad suficiente para]

Previamente al proceso de liofilización se determina el tamaño y carga superficial de las nanopartículas. Las nanopartículas obtenidas tienen un tamaño medio inferior a los 200 nm y una carga neta superficial negativa (-20,1 ± 3,2 mV). El rendimiento del proceso de fabricación se obtuvo mediante la determinación de su peso tras el proceso de liofilización. Partiendo de 100 mg de copolímero se determinó la cantidad transformada en nanopartícula al terminar el proceso, y se expresó como porcentaje respecto a la masa inicial del copolímero.

La cuantificación y detección del extracto se llevó a cabo por el método del ácido bicinónico. Para ello, antes de añadir el agente reticulante, se recoge una alícuota (1 mL) de la suspensión de nanopartículas. Las nanopartículas se rompen añadiéndoles NaOH 0,1N, esta mezcla se analiza por el método colorimétrico del ácido bicinónico para proteínas previa validación del método. La validación se ha realizado con el extracto disuelto en nanopartículas vacías rotas en NaOH 0,1N. La solución de ácido bicinónico junto con el sulfato cúprico al 5% en proporción 100:2, se añade sobre la muestra, la mezcla se mantiene a 37°C durante media hora y a continuación, se mide espectrofotométricamente a 562 nm.

La carga de extracto se expresa como la cantidad de extracto en µg por mg de nanopartículas y la eficacia de encapsulación se determina relacionando la cantidad total de extracto encapsulado con la cantidad inicial.

En la Tabla 2 se refleja la carga de extracto antigénico en nanopartículas (µg de extracto/mg nanopartícula) y la eficacia de encapsulación (%).

TABLA 2

Características físico-químicas de las nanopartículas de Gantrez® AN 119 cargadas con el extracto antigénico

Formulación	Tamaño (nm)	Extracto encapsulado (µg/mg)	Eficacia encapsulación ^a (%)
NP	171,4± 3,9	---	---
NP-HE <i>S. Enteritidis</i>	178 ± 55,4	18,1 ± 6,6	45,2 ± 5,4

^a: La eficacia de encapsulación hace referencia al porcentaje de HE encapsulado, se calculó como la cantidad de extracto antigénico encapsulado por 100 entre la cantidad inicial.

La Figura 9 refleja el patrón proteico del HE de *S. Enteritidis*, donde, se pueden diferenciar los distintos componentes: porinas (aproximadamente 36 kDa), OmpA (34 kDa) y las fimbrias SEF14 (14 kDa) y SEF21 (21 kDa). Se pudo constatar, mediante la realización de una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e inmunoblotting, que el extracto encapsulado conservaba su integridad estructural y antigenicidad. En la Figura 10 se puede observar el perfil antigénico del extracto antes y después de su encapsulación.

Ejemplo 7

Estudio de la protección conferida por la vacuna NP HE 3934 administrada vía intraperitoneal en ratones

Se utilizaron lotes de ratones BALB/c de 9 semanas de edad, cada uno compuesto por 10 animales. La vacunación se realizó con la preparación vacunal de nanopartículas (NP HE 3934) descrita en el Ejemplo 6 a razón de 30 µg de extracto por animal, incluyendo además como controles: i) la misma cantidad de las correspondientes nanopartículas vacías; ii) 30 µg/animal del extracto HE libre, no encapsulado; iii) 200 µL de la vacuna comercial Salenvac® (Intervet UK Limited, Walton, Inglaterra); iv) solución salina.

Diez días después de la vacunación, fueron inoculados por vía intraperitoneal con una dosis letal de 10² UFC de la cepa *S. Enteritidis* 3934, y se realizaron desde ese momento recuentos de los animales que morían por salmonelosis. Los resultados del experimento de protección demuestran que la preparación vacunal basada en nanopartículas (NP HE 3934) protegió frente a *S. Enteritidis* por vía subcutánea de una forma similar a la vacuna comercial Salenvac®, así como el extracto antigénico HE administrado de forma libre (HE Se 3934).

Los resultados muestran que la encapsulación de los extractos HE en nanopartículas no incrementan los niveles de protección en los ratones. Por otro lado, la inmunización de ratones con nanopartículas vacías inducen una respuesta inmune inespecífica que confiere protección durante tres semanas. No obstante, hay que indicar que la vía de administración del antígeno HE tanto libre como encapsulado fue la intraperitoneal. Estudios previos sugieren que una administración oral o intranasal de los antígenos no encapsulados provocaría su degradación antes de su llegada a los sitios de interacción con las células presentadoras de antígenos.

Además, pasados 10 días de la vacunación, se realizaron en el momento de la infección experimental estudios de la inmunidad conferida por las nanopartículas, cuantificando los niveles de producción de IFN-γ e IL-4 (propias de respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2, respectivamente) por células de bazo de los ratones (Figura 12). También se determinó la producción de anticuerpos IgG_{2a} e IgG₁ (respuesta Th1 y Th2, respectivamente) en sangre (Figura 13).

Para estudiar el balance Th1/Th2 inmunitario inducido por los extractos HE libres y encapsulados en los ratones empleados en el estudio, se determinaron los niveles de IFN-γ y de IL-4 producidos por las células esplénicas de los animales inmunizados (Figura 12). El panel A muestra los niveles de IFN-γ inducidos, indicando un aumento de dicha producción en los ratones inmunizados con las nanopartículas (NP HE 3934). Por el contrario, el panel B muestra cómo no existe un incremento significativo en la producción de IL-4 en ratones inmunizados con el extracto HE libre (HE 3934) y los inmunizados con las nanopartículas NP HE 3934. A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que la encapsulación de los extractos HE en nanopartículas favorece un incremento de las respuestas de tipo Th1, reflejado por un incremento en la producción de IFN-γ, frente a Th2.

La producción de anticuerpos específicos frente a los extractos HE de *S. Enteritidis* 3934 en los ratones inmunizados se estudió mediante ELISA indirecto (Figura 13). Los ratones no inmunizados, o inmunizados con nanopartículas vacías (NP vacías), no produjeron anticuerpos IgG_{2a} ni IgG₁ frente al extracto HE de *S. Enteritidis* 3934. Los niveles

ES 2 246 695 B1

de IgG_{2a} detectados fueron mayores que los de IgG₁ en todos los sueros de ratones analizados por ELISA. No obstante, no se observó un incremento en la respuesta serológica en los ratones inmunizados con las nanopartículas con extractos HE encapsulados (NP HE 3934) frente a la respuesta mostrada por los ratones inmunizados con los extractos HE libres (HE 3934).

5

IgG_{2a} es un isotipo de anticuerpo dominante en las respuestas inmunes Th1, mientras que IgG₁ lo es de las de tipo Th2, lo cual confirmaría los resultados obtenidos en el ensayo de liberación de IFN- γ e IL-4, indicando que la administración por vía intraperitoneal de nanopartículas con extractos HE de *S. Enteritidis* induce una respuesta inmune predominante de tipo Th1. Esta administración confiere un grado de protección frente a la salmonelosis similar a la observada al administrar el antígeno libre. No obstante, como se comentó anteriormente, la aplicación de estos antígenos no encapsulados por vía de las mucosas no otorgaría estos niveles de protección observados en este experimento, debido a la degradación ácida y enzimática que sufrirían a su paso por el tracto gastrointestinal de los animales.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 246 695 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria que comprende nanopartículas a base de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA).
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dichas nanopartículas a base de PVM/MA comprenden, además, un alérgeno o un antígeno.
- 10 3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho alérgeno o antígeno recubre al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas y/o está contenido en el interior de dichas nanopartículas.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichas nanopartículas a base de PVM/A comprenden, además, un agente inmunoestimulante.
- 15 5. Composición según la reivindicación 4, en la que dicho agente inmuno-estimulante recubre al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas y/o está contenido en el interior de dichas nanopartículas.
- 20 6. Composición según la reivindicación 1, en la que dichas nanopartículas a base de PVM/MA comprenden, además, un alérgeno o un antígeno y un agente inmunoestimulante.
7. Composición según la reivindicación 6, en la que dichos alérgeno o antígeno y agente inmunoestimulante recubren al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas y/o están contenidos en el interior de dichas nanopartículas.
- 25 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dichas nanopartículas comprenden, además, un agente reticulante.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que dicho agente reticulante comprende una poliamina o un glúcido.
- 30 10. Composición según la reivindicación 9, en la que dicho agente reticulante es 1,3-diaminopropano.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas nanopartículas tienen un tamaño medio igual o inferior a 1,0 micrómetro, preferentemente entre 10 y 900 nm, más preferentemente, igual o inferior a 400 nm.
- 35 12. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho copolímero 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.
- 40 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma liofilizada.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en una forma de administración adecuada para su administración por vía oral o parenteral.
- 45 15. Una vacuna o una composición para inmunoterapia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 16. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 15, en forma liofilizada o en una forma de administración adecuada para su administración por vía oral o parenteral.
17. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 15, en la que dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria comprende nanopartículas a base de PVM/MA vacías y, si se desea, un agente reticulante, en combinación con una composición vacunal o inmunoterapéutica que comprende un antígeno o un alérgeno.
- 55 18. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 15, en la que dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria comprende nanopartículas a base de PVM/MA que comprenden, además, un alérgeno o un antígeno, y, si se desea, un agente reticulante.
- 60 19. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 15, en la que dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria comprende nanopartículas a base de PVM/MA que comprenden, además, un agente inmunoestimulante, y, si se desea, un agente reticulante.
- 65 20. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 15, en la que dicha composición estimuladora de la respuesta inmunitaria comprende nanopartículas a base de PVM/MA que comprenden, además, un alérgeno o un antígeno y un agente inmunoestimulante, y, si se desea, un agente reticulante.

ES 2 246 695 B1

21. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 15, que comprende:

	<u>Componente</u>	<u>% en peso respecto al total</u>
5	Nanopartículas de PVM/MA	84-99,998%
	Agente reticulante	0,001-1%
	Alergeno o antígeno	0,001-15%

10 22. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 21, que comprende, además, un agente crioprotector.

15 23. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 21 ó 22, en la que dicho alergeno comprende un extracto alergénico de polen, un extracto alergénico de un insecto o un extracto alergénico de un producto alimenticio.

24. Vacuna o composición para inmunoterapia según la reivindicación 21 ó 22, en la que dicho antígeno comprende un extracto inmunogénico procedente de un organismo.

20 25. Empleo de una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la elaboración de una vacuna o composición para inmunoterapia.

25 26. Empleo de una composición estimuladora de la respuesta inmunitaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmunitaria Th1, o en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación selectiva de la respuesta inmunitaria Th2, o en la elaboración de una composición farmacéutica para la estimulación, de forma balanceada, de las respuestas inmunitarias Th1 y Th2.

30 27. Un procedimiento para la producción de nanopartículas a base de un copolímero de PVM/MA que comprenden un alergeno o un antígeno, en donde dicho alergeno o antígeno recubre al menos parcialmente la superficie de dichas nanopartículas y/o está contenido en el interior de dichas nanopartículas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

35 a) desolvatación de una solución orgánica de un copolímero de PVM/MA disuelto en un disolvente orgánico con una solución hidroalcohólica;

b) eliminación de los disolventes orgánicos para obtener nanopartículas, y

40 c) adición de dicho alergeno o de dicho antígeno a dicha solución orgánica de copolímero de PVM/MA antes de efectuar la desolvatación de dicha solución orgánica del copolímero de PVM/MA o, alternativamente, incubar dicho alergeno o dicho antígeno con dichas nanopartículas obtenidas en la etapa b).

45 28. Procedimiento según la reivindicación 27, que comprende, además, la incubación del producto resultante de la etapa a) con un agente inmunoestimulante, o alternativamente, la incubación de las nanopartículas resultantes de la etapa b) con un agente inmunoestimulante.

29. Procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, en el que dicho disolvente orgánico en el que se disuelve el copolímero de PVM/MA es acetona, dicha solución hidroalcohólica comprende etanol y agua, y la relación solución de copolímero:solución hidroalcohólica está comprendida entre 1:1 y 1:10, preferentemente 1:4.

50 30. Procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, en el que dicho disolvente orgánico en el que se disuelve el copolímero de PVM/MA es acetona, dicha solución hidroalcohólica comprende etanol y agua, y la relación solución de copolímero:solución hidroalcohólica está comprendida entre 1:1 y 1:10, preferentemente 1:4.

55 31. Procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, que comprende una etapa adicional de incubación de las nanopartículas formadas con un agente reticulante.

32. Procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, que comprende una etapa adicional de purificación de las nanopartículas formadas.

60 33. Procedimiento según la reivindicación 27 o 28, que comprende una etapa adicional de liofilización, opcionalmente en presencia de un agente crioprotector.

65

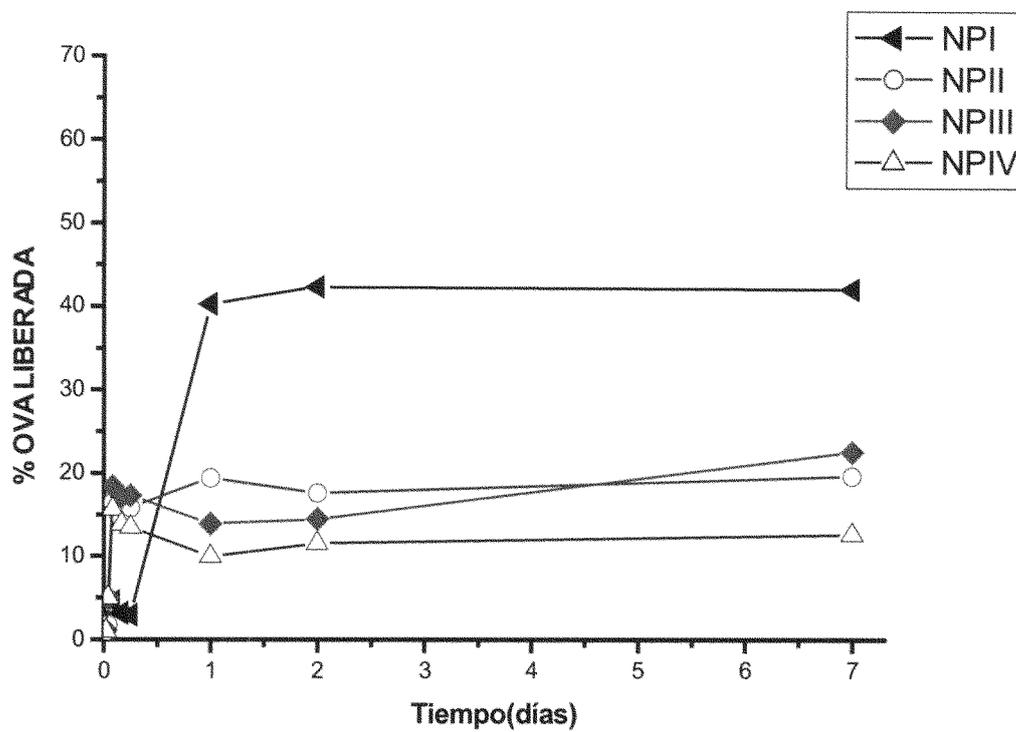


Figura 1

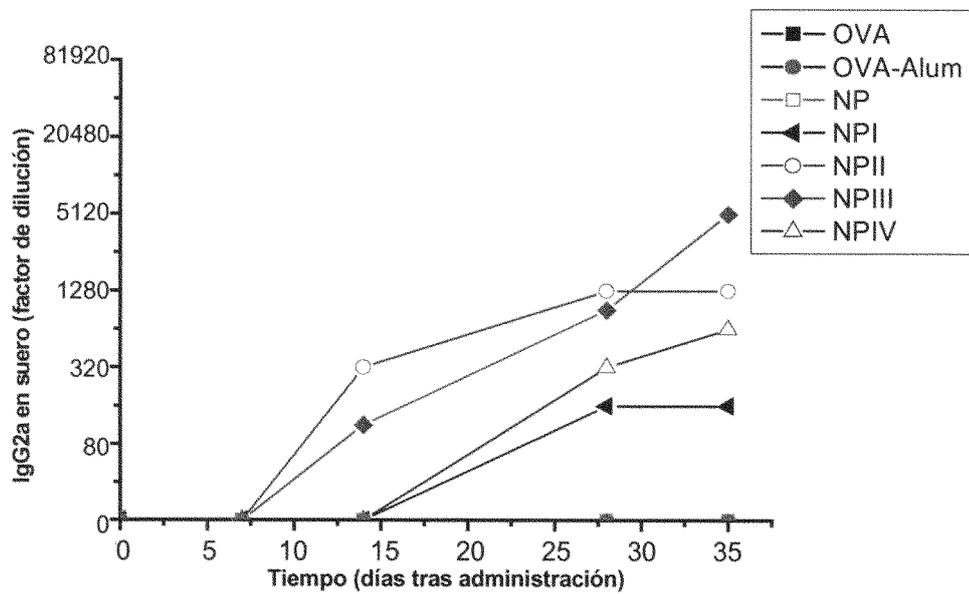
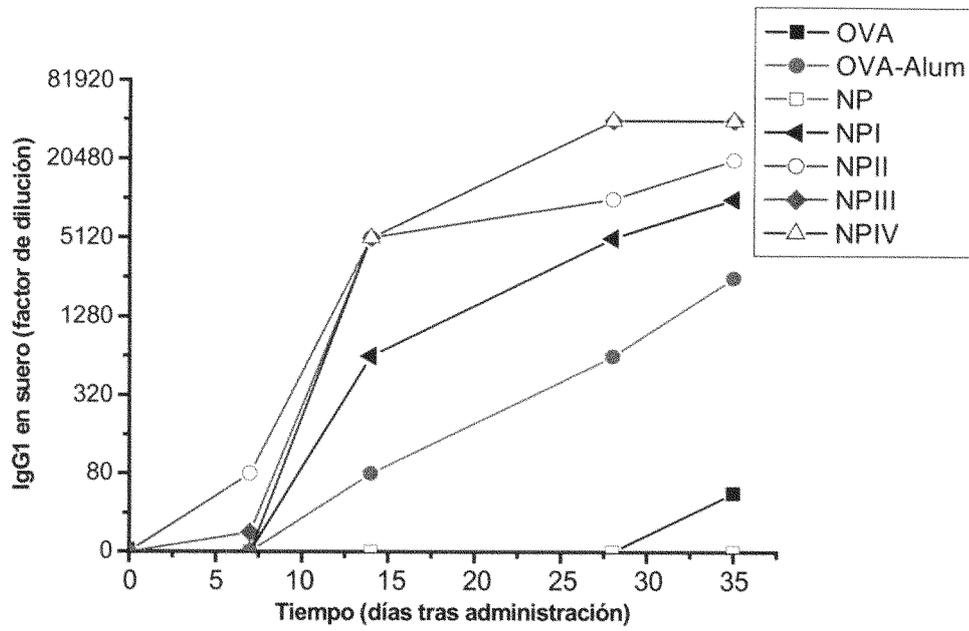


Figura 2

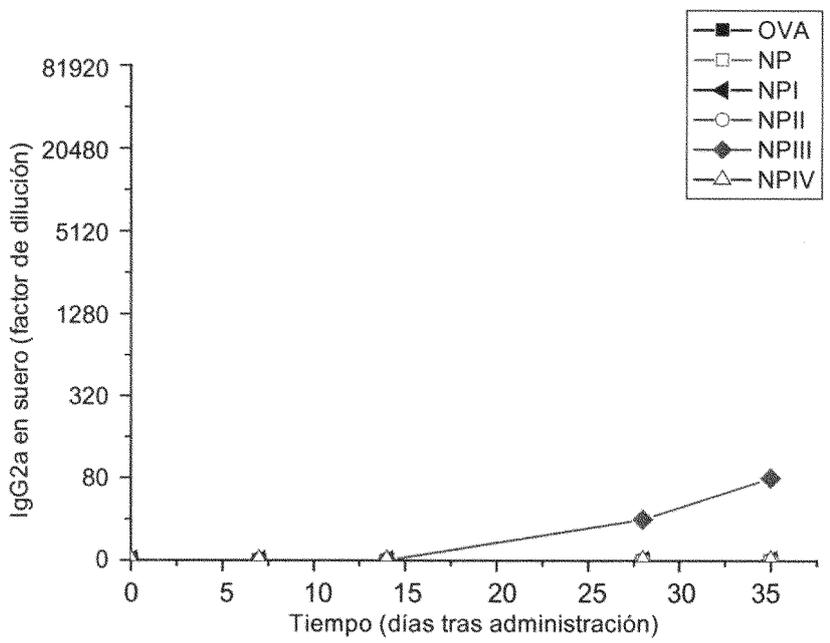
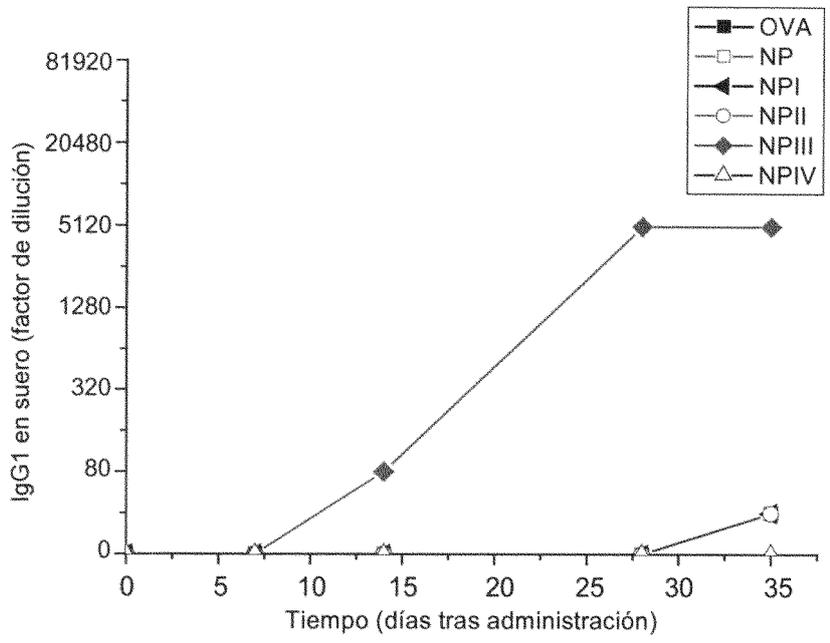


Figura 3

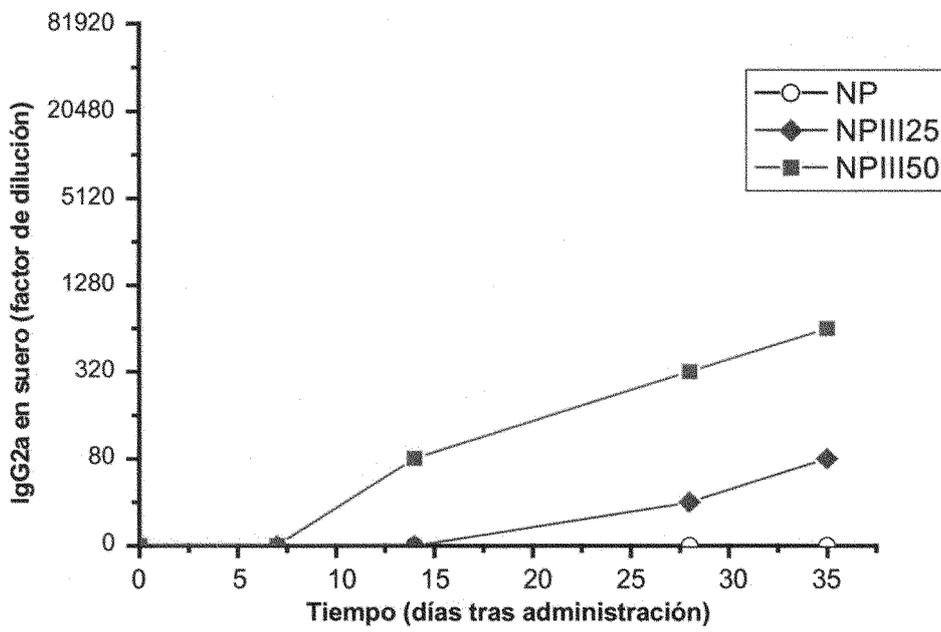
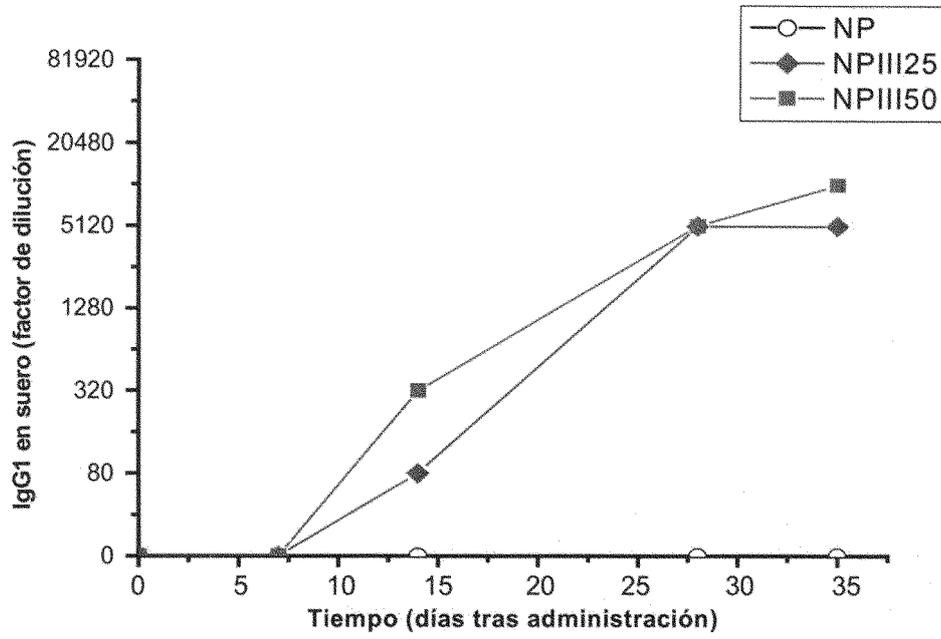


Figura 4

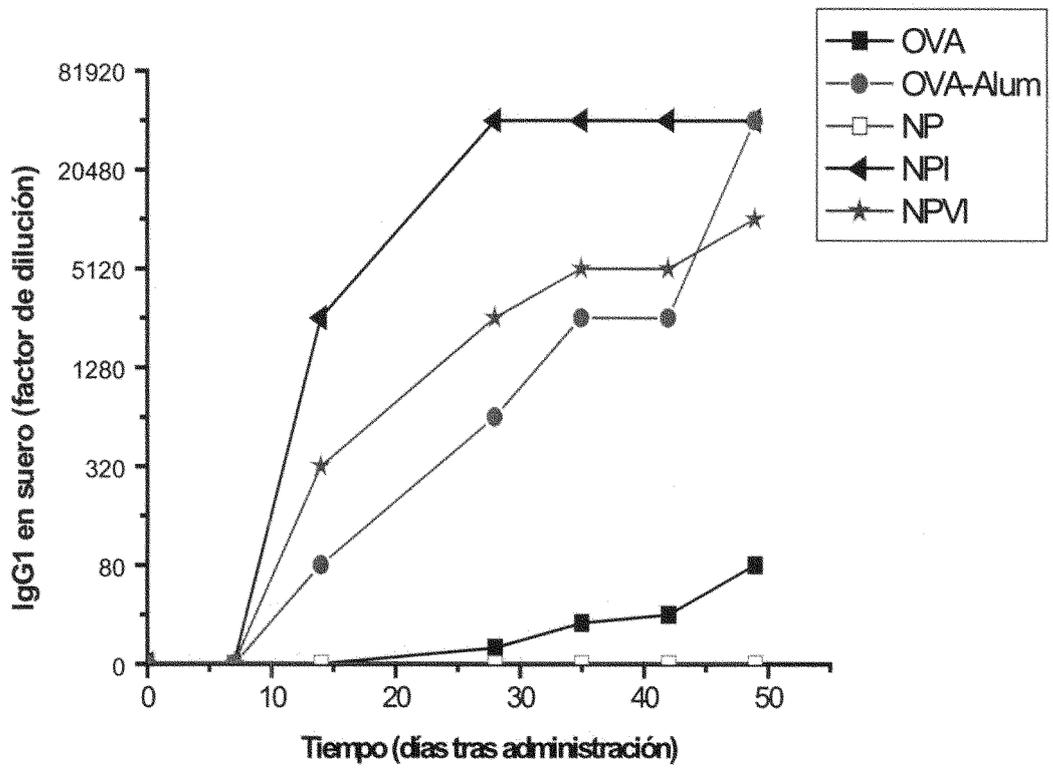
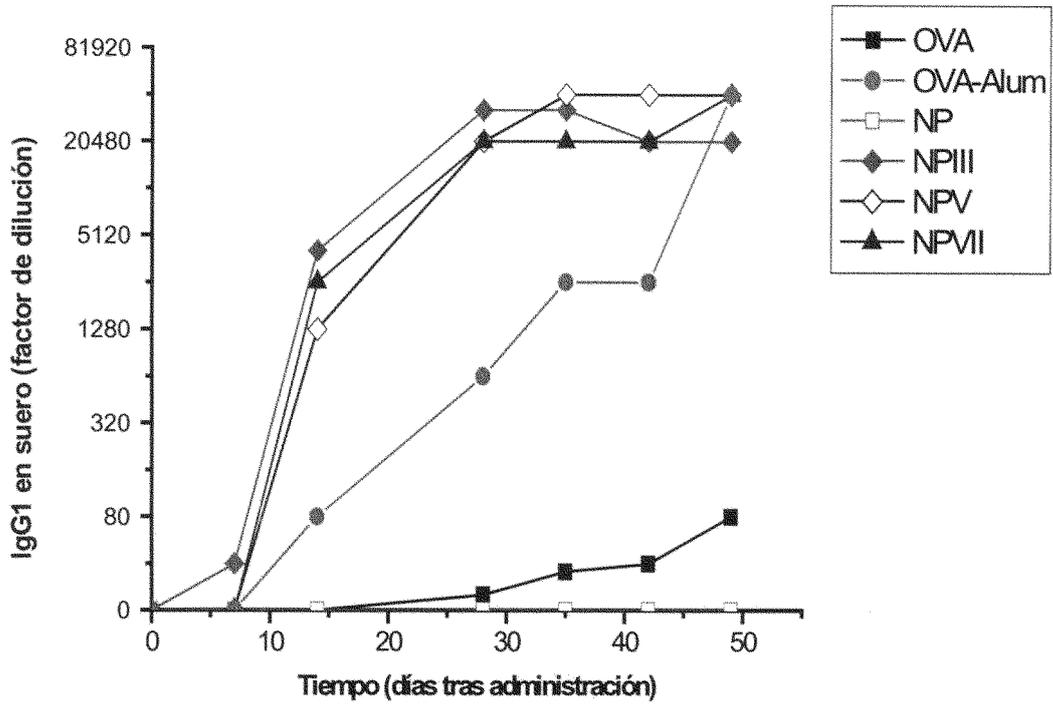


Figura 5

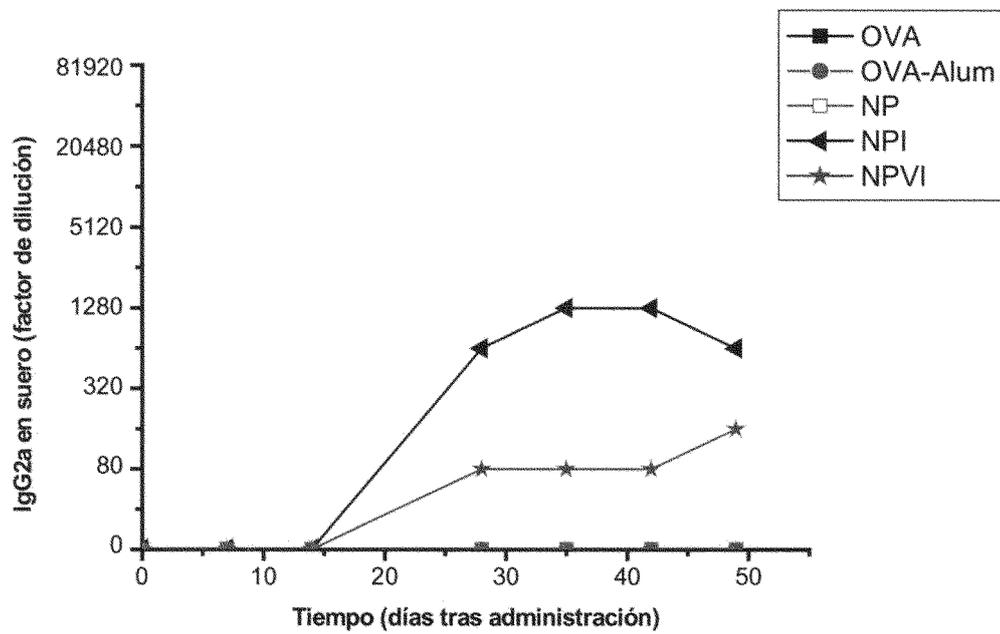
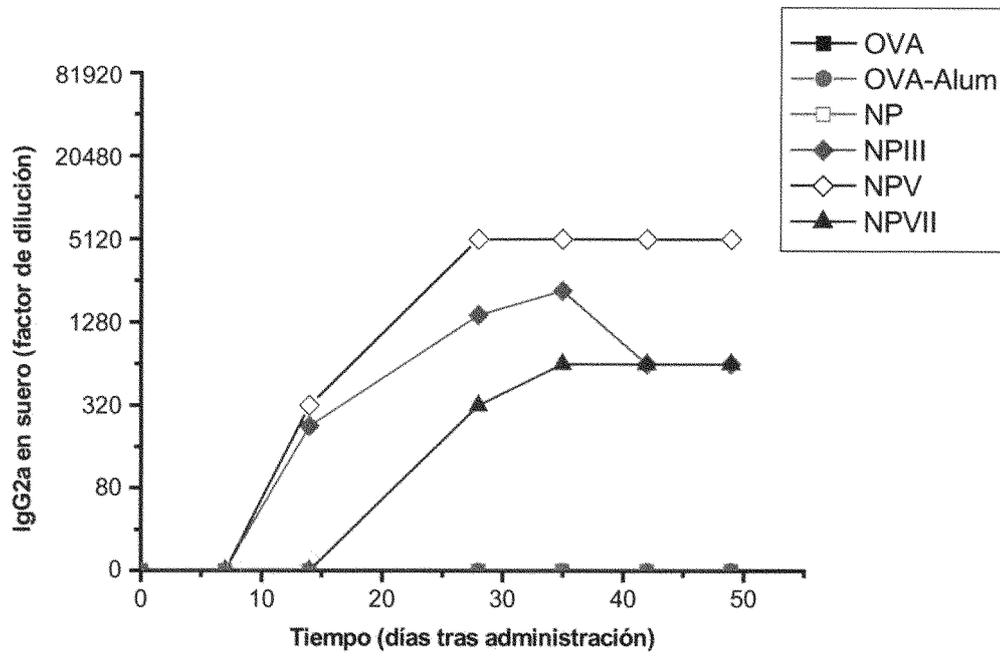


Figura 6

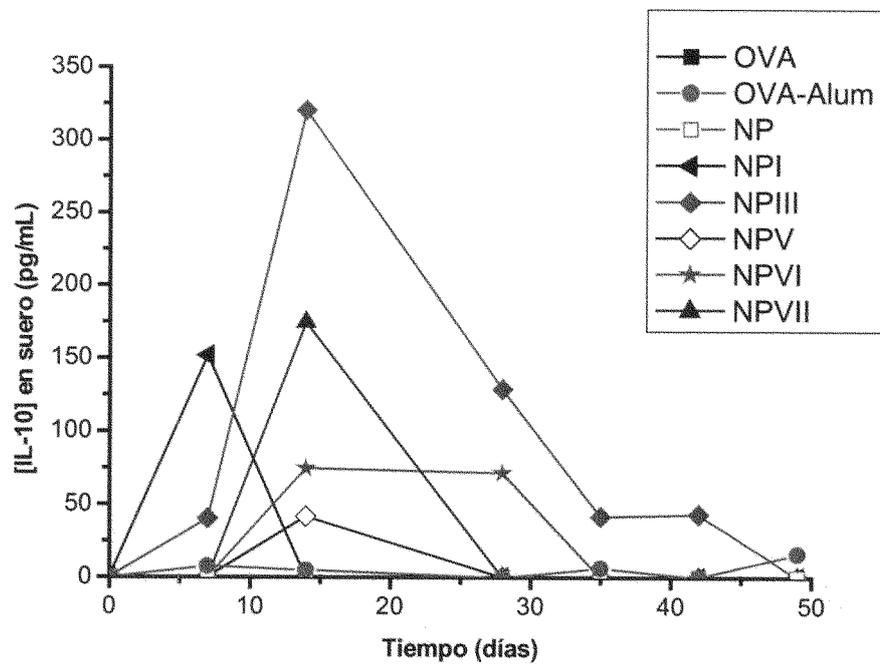


Figura 7

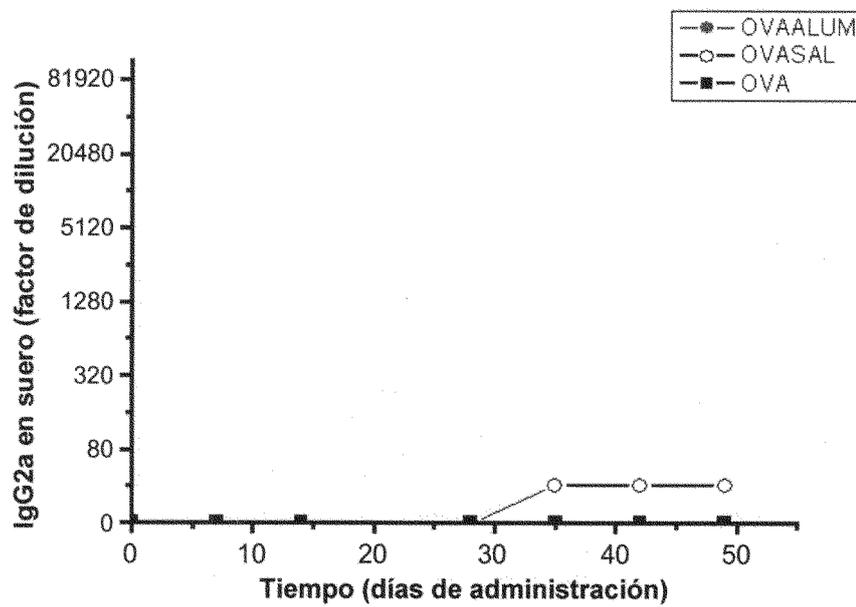
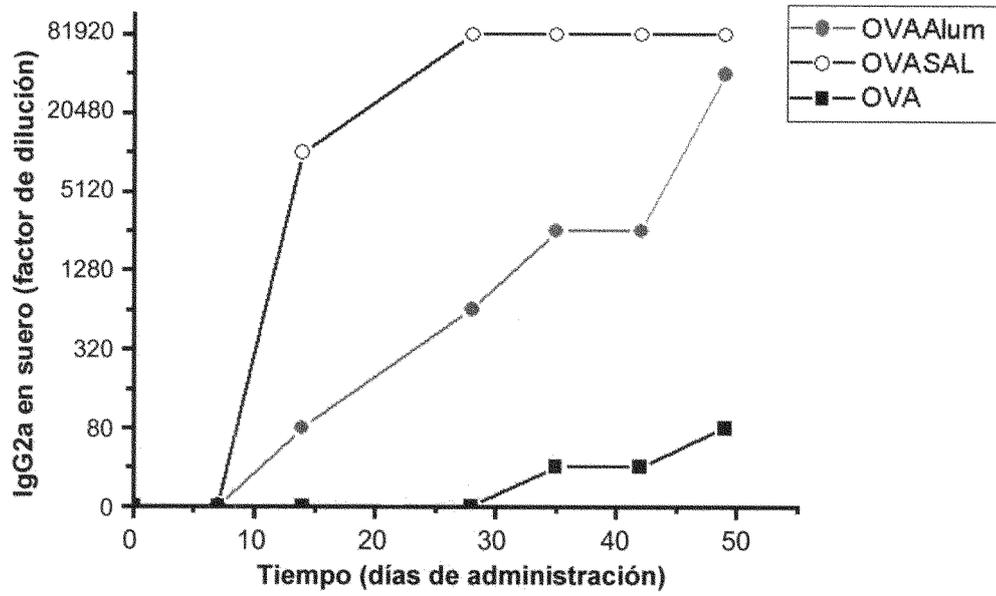


Figura 8

ES 2 246 695 B1

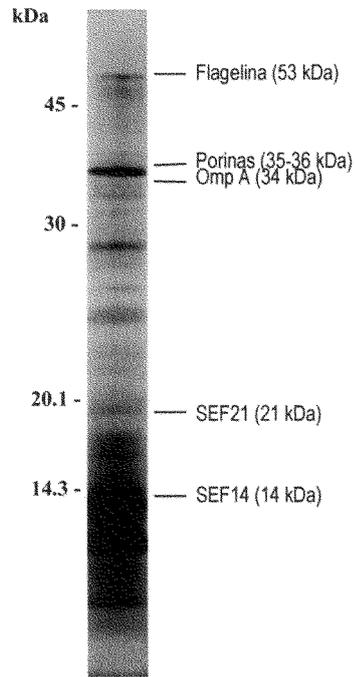


Figura 9

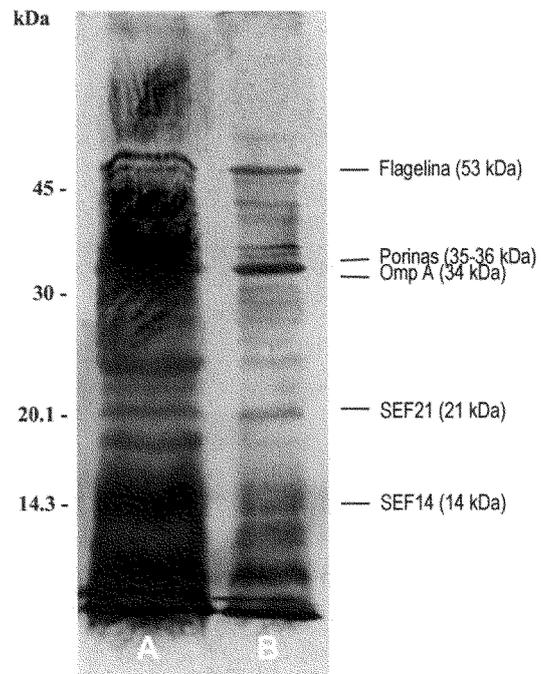


Figura 10

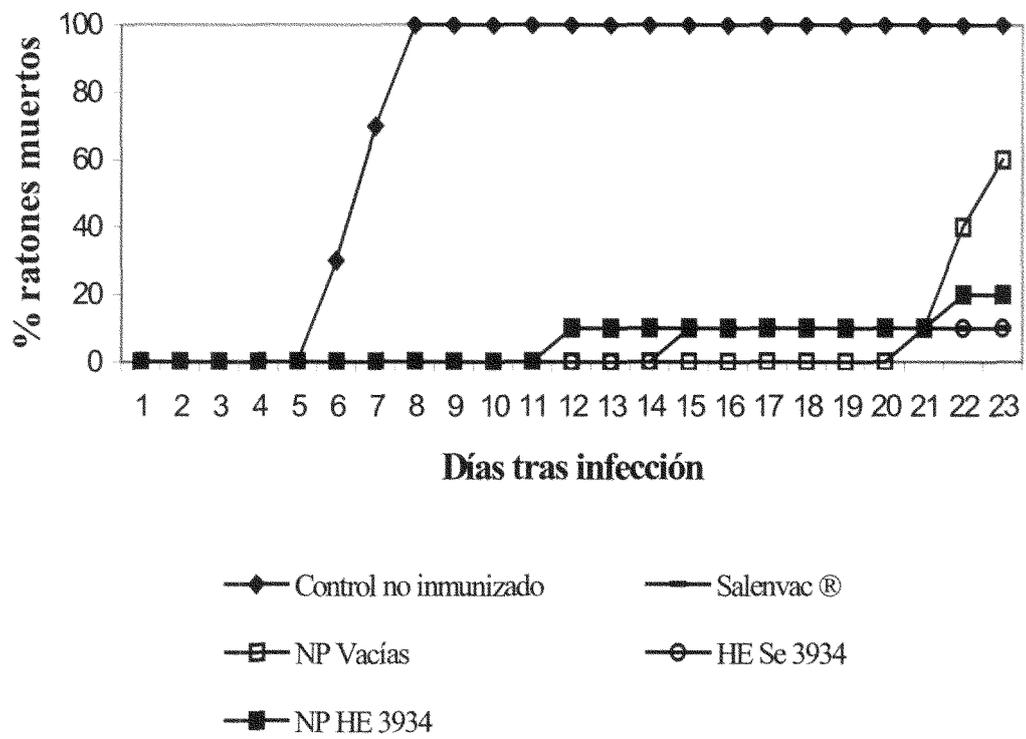


Figura 11

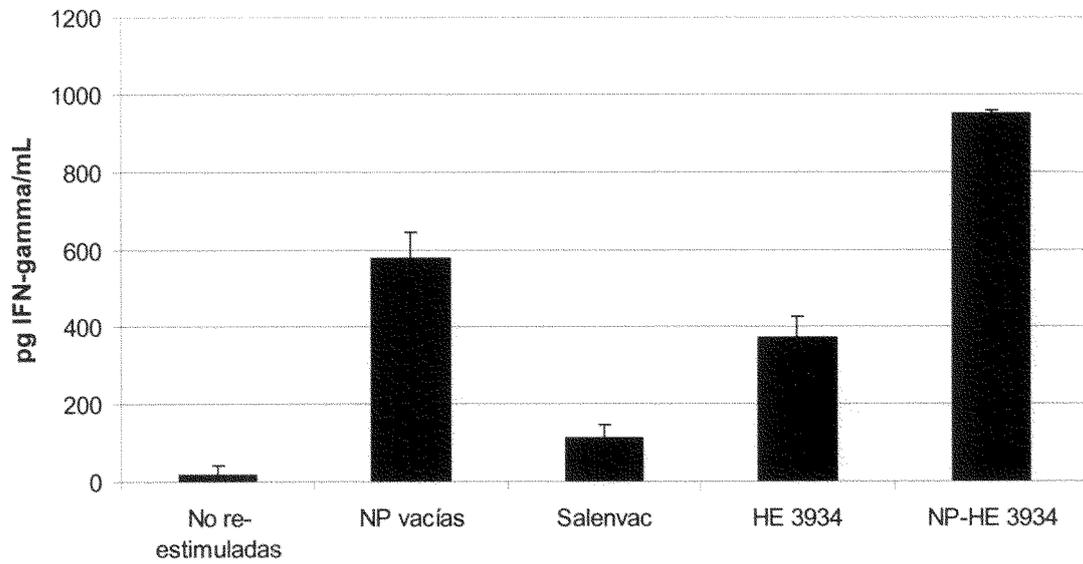


Figura 12 A

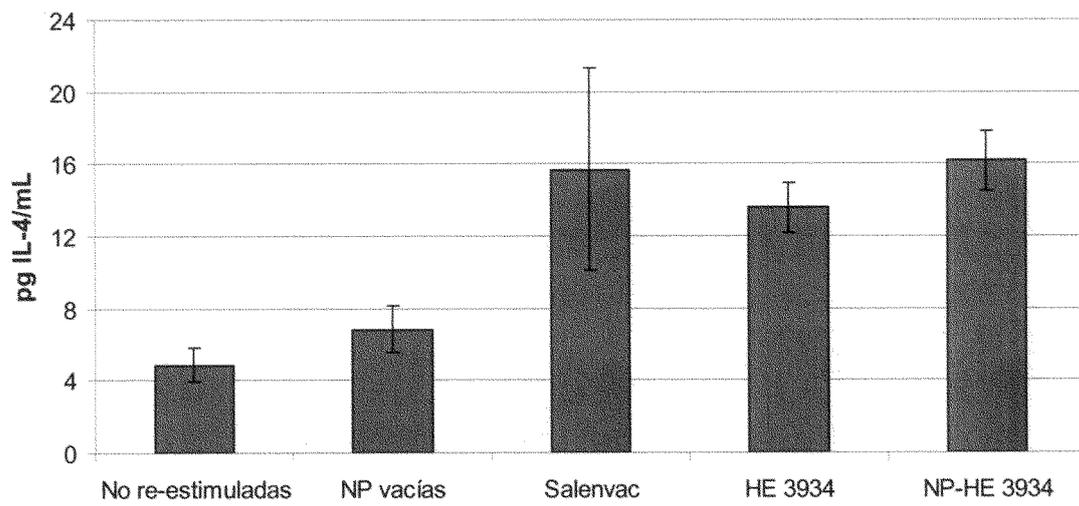


Figura 12 B

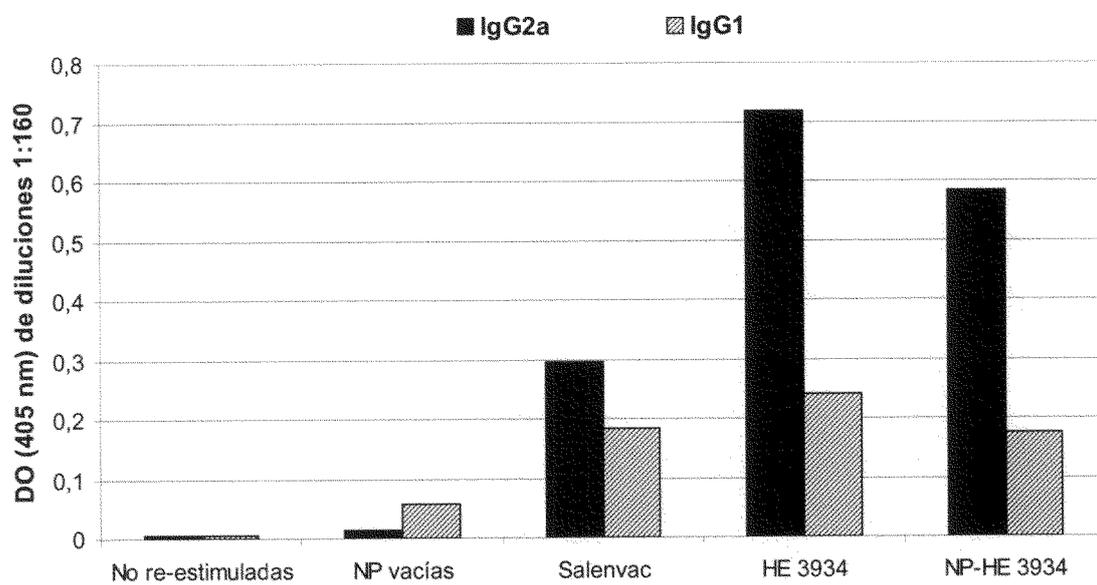


Figura 13



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 246 695

② Nº de solicitud: 200401023

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.04.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 9/51** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02069938 A1 (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.) 12.09.2002, todo el documento.	1,8-16
X	ARBÓS, P. et al. Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. Journal of Controlled release 83 (2002), Volumen 3, páginas 321-330.	1,8-14
X	ARBÓS, P. et al. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 242, 1-2, (2002), páginas 129-136.	1,8-14
A	EP 275796 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 27.07.1988, todo el documento.	1-33

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

03.11.2005

Examinador

N. Vera Gutiérrez

Página

1/1