



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 182**

51 Int. Cl.:
C08G 85/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00104920 .4**
96 Fecha de presentación : **08.03.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1132416**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

54 Título: **Vehículos nanoparticulados coloidales que contienen polímeros en peine solubles en agua cargados o sin cargar y su uso para administración mucosa.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.09.2010

73 Titular/es: **NANOHALE GmbH**
Otto-Hahn-Strasse 15
44227 Dortmund, DE

72 Inventor/es: **Kissel, Thomas;**
Breitenbach, Armin;
Jung, Tobias y
Kamm, Walter

74 Agente: **Roeb Diaz-Álvarez, María**

ES 2 345 182 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vehículos nanoparticulados coloidales que contienen polímeros en peine solubles en agua cargados o sin cargar y su uso para administración mucosa.

La presente invención tiene como objeto un vehículo coloidal que contiene, preferiblemente en forma de nanopartícula, como polímero de vehículo un polímero en peine anfífilo soluble en agua y concretamente como columna vertebral (esqueleto) al menos un poliol soluble en agua (-g-) injertado con cadenas laterales hidrófobas y dado el caso grupos iónicos. La invención se refiere preferiblemente al uso de tales vehículos particulados coloidales para administración mucosa.

Hay una gran necesidad de proporcionar nuevos “sistemas de liberación de fármacos” en el marco de la farmacoterapia moderna. Las formulaciones de principios activos y las combinaciones de principios activos que llevan al principio activo a una forma administrable son cada vez más importantes y a este respecto influyen positivamente especialmente en la estabilidad del principio activo, su biodistribución, biodisponibilidad y/o resorción. Debido a los grandes avances en la biología molecular, la tecnología genética y la biotecnología, cada vez está disponible un número cada vez mayor de principios activos macromoleculares hidrófilos como, por ejemplo, proteínas (proteínoides), (constructos de) ácidos nucleicos junto con derivados y factores de crecimiento, vacunas, etc. No obstante, la administración humana o veterinaria de estas biomoléculas sin vehículos adecuados se dificulta por numerosos efectos secundarios no deseados o incluso no es posible en parte.

Deben exigirse requisitos muy especiales a los sistemas de liberación de fármacos adecuados que pueden adherirse a mucosas (la llamada bioadhesión) y activar éstas o MALT (tejidos linfoides asociados a mucosa “associated lymphoid tissues”) e inducir una respuesta inmunitaria sistémica. Tales sistemas cuyos vehículos son biodegradables se consideran en general ventajosos o son compatibles para una administración crónica. Especialmente ventajoso es el uso de vehículos cuyos componentes individuales se derivan de clases de polímeros como es sabido compatibles (es decir: biocompatibles). Tales sistemas capacitados -en el marco de una administración mucosa o transmucosa- se han descrito poco hasta la fecha en la bibliografía. Tales sistemas de vehículos anteriormente descritos en forma de nanopartículas se consideran en general ventajosos (Carino, Mathiowitz, Adv. Drug Delivery Rev. 35(1999). 249-257; Allémann, Leroux, Gurny, Adv. Drug Delivery Rev. 34(1998), 171-189).

La publicación -Breitenbach, Kissel, Polymer 39, 3261, 1998- da a conocer un procedimiento para la preparación de polímeros en peine con una columna vertebral de poli(alcohol vinílico) (esqueleto de PVA) que se injertó con alfa-hidroxiácidos hidrófobos y concretamente ácido poli(láctico-co-glicólico) (abreviatura: PLG) obteniéndose PVA-g-PLG. A este contenido de publicación se hace referencia explícita en el marco de esta invención.

Los polímeros en peine de este tipo se consideran ventajosos ya que presentan una alta biocompatibilidad, así como un carácter anfífilo deseado y pueden ser solubles en agua bajo determinadas condiciones.

En Breitenbach, Nykamp, Kissel, Self-assembling colloidal carriers for protein delivery: nanoparticulate polymer protein conjugates with novel watersoluble biodegradable comb polyolesters, Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 26 (1999) 248 se modifican tales polímeros en peine PVA-g-PLG para dar sulfobutil-PVA-g-PLG cargado soluble en agua.

Los polímeros en peine cargados y sin cargar de este tipo (cargado: polielectrolito en peine) han demostrado ser adecuados en presencia de una disolución de proteínas para establecer un vehículo coloidal que tiende a la autoagregación con obtención de nanopartículas. El control de la autoagregación se describe, además de las propiedades de polímeros, como pH y en función de la temperatura.

Sin embargo, es desventajoso que no se dé a conocer ninguna exposición técnica que proporcione reproduciblemente tales polímeros completamente solubles en agua.

Sorprendentemente, a partir de tales vehículos coloidales pueden obtenerse nanopartículas que son especialmente adecuadas para añadirse a la mucosa y éstas activan ésta o MALT debido a su tamaño y carga especialmente adecuados.

Por tanto, el objetivo de la invención es proporcionar un vehículo nanoparticulado coloidal que como polímero de vehículo contiene un polímero en peine soluble en agua y/o polielectrolitos en peine con carácter anfífilo con la propiedad de añadirse a la mucosa o MALT, y activar ésta o MALT e inducir una respuesta inmunitaria sistémica.

El objetivo se alcanza proporcionando vehículos particulados coloidales que contienen un polímero en peine soluble en agua, conteniendo el polímero en peine soluble en agua una columna vertebral de al menos un poliol soluble en agua, así como cadenas laterales hidrófobas con formación de un carácter anfífilo y dado el caso grupos iónicos, alcanzando el polímero de columna vertebral un peso molecular medio ($M(w)$) de 10.000 a 30.000 g/mol y junto con cadenas laterales hidrófobas correspondientemente un peso molecular medio ($M(w)$) de preferiblemente 45.000 a 100.000 g/mol, y presentando los vehículos un tamaño de 10 a 800 nm.

En una forma de realización especial, el polímero en peine soluble en agua es un polielectrolito en peine soluble en agua con un gran número adicional de grupos disociables iónicos que como constituyente integral de la cadena

ES 2 345 182 T3

principal del polímero están colgados lateralmente en ésta (en los dientes del peine), además de las cadenas laterales hidrófobas.

Por tanto, se prefiere muy especialmente un polímero en peine soluble en agua completamente lineal y/o polielectrolito en peine que contiene al menos un poliol soluble en agua lineal como esqueleto con una masa molar media (M(w)) de 10.000-30.000 g/mol, con especial preferencia 15000-25000 g/mol y de manera muy especialmente preferida 20.000 g/mol, que con cadenas laterales hidrófobas alcanza un peso molecular (M(w)) de preferiblemente 45.000-100.000 g/mol, con especial preferencia 50.000-80.000 g/mol y de manera muy especialmente preferida 50.000-60.000 g/mol (véase para esto la Tabla 3, allí ejemplos solubles en agua de tales polímeros en peine).

Sorprendentemente, a partir de los vehículos nanoparticulados coloidales obtenidos de los polímeros en peine lineales solubles en agua cargados y sin cargar usados según la invención se obtienen sistemas de liberación de fármacos especialmente adecuados para la administración mucosa.

Por tanto, un objeto de la invención se refiere a la bioadhesión especialmente adecuada de los vehículos nanoparticulados coloidales a mucosas y MALT con la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria sistémica (véanse los ejemplos).

El poliol de columna vertebral se selecciona preferiblemente de la clase de los polímeros que llevan grupos hidroxilo biocompatibles conocidos para el experto como polisacáridos, polialcoholes, poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo), dextranos, dado el caso poliacrilatos y derivados respectivamente correspondientes, no mencionados concluyentemente.

La estructura de polímero en peine según la invención se obtiene según la invención mediante el injerto en el poliol de columna vertebral lineal de polímeros hidrófobos adecuados y concretamente preferiblemente biodegradables o biocompatibles como polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), politartrato, no mencionados concluyentemente.

La realización del polielectrolito en peine se obtiene mediante la modificación del polímero en peine con grupos iónicos adecuados seleccionados como grupos sulfobutilo, sulfopropilo, dietilaminoetilo, dietilaminometilo, carboxilo, fosfato, ácido sulfónico, no mencionados concluyentemente.

En una forma de realización especial, el polielectrolito en peine según la invención contiene una columna vertebral de PVA con cadenas laterales ocupadas que pueden obtenerse a partir de 1,4-butanosulfona, o cloruro de N-(2-cloroetil)-N,N-dietil-amonio o cloruro de N-(2-cloroetil)-N,N-dipropil-amonio y alfa-hidroxiácidos como ácido láctico y ácido glicólico o a partir de sus productos de condensación diméricos.

Por tanto, el polielectrolito en peine lleva funcionalidades de electrolito en cada unidad de repetición de su macromolécula.

Dependiendo del grado de carga de los grupos cargados con grupos -OH (catiónicos/aniónicos) se diferencian ionómeros (menos cargados) de poliácidos y polibases (altamente cargados). La interacción de los polielectrolitos con los principios activos puede realizarse tanto mediante fuerzas electrostáticas como también mediante hidrófobas.

El polielectrolito según la invención se presenta la mayoría de las veces en disolución como una molécula de ovillo extendida mucho más fuerte que la que se conoce de la molécula de polímero sin cargar (véase aquí, por ejemplo, PVA-g-PLG) a consecuencia de la repulsión electrostática intramolecular de los grupos iónicos.

Debe considerarse como especialmente ventajoso la anfifilia y la solubilidad en agua de los polímeros en peine solubles en agua usados con respecto a los posibles principios activos mencionados. Las nanopartículas según la invención pueden obtenerse mediante un procedimiento sorprendentemente sencillo sin incorporar grandes cantidades de energía mecánica o altas fuerzas de cizallamiento, especialmente también sin el uso de disolvente orgánico, tensioactivos, emulsionantes u otros coadyuvantes ventajosos para la posterior tolerancia de la administración.

Además, la invención también se refiere a un procedimiento para la preparación del vehículo polimérico en el que, a partir de un poliol soluble en agua activado, se carga en una primera etapa dado el caso con grupos cargados y en una segunda etapa se une con cadenas laterales hidrófobas (por ejemplo, ésteres, éteres) (véase el Esquema de reacción 1 y el Ejemplo 1 y 2).

En una forma de realización preferida, los grupos cargados son 1,4-butanosulfona (SB) o cloruro de N-(2-cloroetil)-N,N-dietil-amonio (DEAE). En la primera etapa se obtienen DEAE-PVA (catiónico) o SB-PVA (aniónico), que en la segunda etapa forman el polímero en peine mediante poli(ácido láctico-co-glicólico) y concretamente DEAE-PVA-g-PLG y SB-PVA-g-PLG.

La segunda etapa se realiza preferiblemente mediante injerto en masa fundida (Breitenbach, anteriormente) con polimerización en masa fundida con apertura de anillo de la lactida y glicolida.

ES 2 345 182 T3

En el sentido de esta invención, las nanopartículas del vehículo coloidal pueden administrarse (aplicarse) de forma diferente como sublingualmente, subcutáneamente, bucalmente, por vía oral, nasalmente, pulmonarmente, vaginalmente, ocularmente o gastrointestinalmente.

5 Las administraciones de este tipo son de interés para todas las sustancias biológicamente activas farmacéuticamente relevantes cuando se desea un transporte de principio activo sobre, en o por la mucosa (por tanto, según la invención: administración mucosa de los polímeros en peine solubles en agua mencionados). Son especialmente ventajosas para principios activos que se destruyen o inactivan sin la utilización de un vehículo coloidal según la invención en administración sublingual, bucal, oral, nasal, pulmonar, vaginal, ocular o gastrointestinal, o para las que se desea una alta concentración mucosa local (véase, por ejemplo, el toxoide del tétanos).

Por tanto, el vehículo coloidal sirve preferiblemente como vehículo de principio activo. Como principios activos en el marco de esta invención no pueden tomarse en consideración concluyentemente:

15 1) Grupo de los principios activos hidrófilos macromoleculares farmacológicamente relevantes:

a.) Vacunas que se seleccionan del grupo: vacunas atenuadas, vacunas inactivadas, vacunas de toxoides, constructos de ADN, así como su preparación adyuvantada dado el caso dirigida hacia gérmenes patógenos o sus metabolitos patógenos de los que por la bibliografía se conoce la vía de penetración mucosa o que colonizan predominantemente superficies mucosas como, por ejemplo, *Helicobacter pylori*, salmonelas tififormes, *Vibrio cholerae*, neisserias (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*), *Entamoeba histolytica*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, virus de la hepatitis A, estafilococos colonizadores del colon o la vagina, estreptococos tipo A y B, klebsiellas (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis*), shigelas, yersinias, vibriones, *Pseudomonas aeruginosa*, legionelas, *Korynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, micobacterias (*M. tuberculosis*, *M. leprae*), *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, clamidias (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*), virus de la poliomielitis, rinovirus, mixovirus (virus del sarampión, virus de las paperas, virus paragripal), virus de la rubeola, rotavirus, adenovirus, virus de la gripe, virus del herpes (virus varicela-Zoster, citomegalovirus, virus del herpes simple, VEB), VHA, VHE;

b.) Vacunas que se seleccionan del grupo: vacunas atenuadas, vacunas inactivadas, vacunas de toxoides, constructos de ADN, así como su preparación adyuvantada dado el caso dirigida hacia gérmenes patógenos o sus metabolitos patógenos en los que se presenta de forma conocida una ruta de infección parenteral, pero una administración mucosa provoca un título de inmunoglobulina específico sistémico como, por ejemplo, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi*, virus de la rabia, VIH-1 y VIH-2, VHB, VHC, VHD;

c.) Proteínas, péptidos, glico y lipopéptidos como, por ejemplo, insulina, calcitonina, eritropoyetina, factor estimulante de granulocitos (GcSF), factor estimulante de fibroblastos (FGF), hormona paratiroidea (PTH), somatostatina, representantes del grupo de las aminocandinas, ciclosporina.

Los principios activos pueden mezclarse en disolución acuosa en presencia de los polímeros en peine solubles en agua mencionados, pudiendo obtenerse en la autoagregación los vehículos nanoparticulados coloidales ventajosos que contienen el principio activo deseado.

Las ventajas de sistemas de este tipo que van a formarse espontáneamente a partir de disoluciones acuosas son obvias, entre otras, no se necesitan tecnologías de preparación especiales, no son necesariamente obligatorios coadyuvantes reductores de las propiedades del agente terapéutico como, por ejemplo, disolventes orgánicos, emulsionantes, etc.

Se reconoce que es especialmente ventajoso cuando los vehículos nanoparticulados coloidales presentan tamaños de 10 a 800 nm, preferiblemente inferiores a 500 nm, con especial preferencia en el intervalo de 30-200 nm.

El tamaño que va a lograrse depende del tamaño, la carga y la flexibilidad, elasticidad del principio activo seleccionado y del polímero en peine sin cargar cargado seleccionado. Tamaños en el intervalo inferior a 200 nm son especialmente adecuados para la administración mucosa.

A este respecto se encontró que el intervalo de tamaño inferior a 500 nm de diámetro según la invención es especialmente muy adecuado para administración mucosa ya que sorprendentemente se ajustó una concentración de principio activo especialmente elevada en células relevantes, así como puede inducirse *in vivo* una respuesta inmunitaria sistémica correspondiente (véanse Florence, The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. Pharm. Res. (1997), 14(3), 259-266 y Florence; Hillery; Hussain; Jani, P.U.; Oral uptake and translocation of nanoparticles: a real but useful phenomenon? NATO ASI Ser., Ser. A (1994), fecha del volumen 1994, 273 173-81.).

Debido a las propiedades, por una parte, ampliamente variables, por otra parte, muy específicamente ajustables, los vehículos nanoparticulados coloidales según la invención muestran perfiles de propiedades que también están predestinados especialmente para una administración mucosa. En la bibliografía se sabe que el transporte de partículas depende del tamaño, las nanopartículas según la invención se encuentran en un intervalo que se considera en general

ES 2 345 182 T3

favorable para el transporte. Los polielectrolitos en peine según la invención pueden estar cargados positivamente -las mucosas negativamente- y por tanto provocan una mejor bioadhesión.

Otras ventajas que resultan de la invención son el tipo de administración más agradable para los pacientes ya que no debe aplicarse obligatoriamente de forma parenteral, es decir, mediante una inyección, y la elevada conformidad "del paciente" asociada al mismo. Mediante esto puede realizarse, en comparación con el procedimiento anterior durante la administración de principios activos de proteínas y péptidos o el procedimiento de vacunación, un efecto terapéutico de la proteína o una vacuna protectora, por ejemplo mediante la ingesta de un comprimido o disolución, similar a la administración por vía oral de ciclosporina o la vacuna de la poliomielitis.

Ejemplos

Los ejemplos sirven para explicar en más detalle la invención sin limitar ésta a los ejemplos.

Materiales: Se compró PVA con un peso molecular de 15.000 g/mol y un grado de hidrólisis del 88% de Fluka. Antes de uso, el PVA se secó a 80°C a vacío hasta peso constante. La D,L-lactida y la glicolida (Boehringer Ingelheim) se recrystalizaron dos veces en acetato de etilo seco (reflujo sobre hidruro de calcio) y se secaron 48 h a vacío. Se usaron octoato de estaño (Aldrich), 1,4-butanosulfonas (puras, Fluka), cloruro de N-(2-cloroetil)-N,N-dietil-amonio (Merck-Suchard) y otros materiales con pureza analítica. Para la preparación de los polímeros según la invención se remite al documento Breitenbach, Kissel, Polymer 39, 3261, 1998.

Ejemplo 1

Síntesis de polímeros

Preparación del polielectrolito

Se prepararon sulfobutil-PVA (SB(xx)-PVA) y dietilaminoetil-PVA (DEAE(xx)-PVA) a partir de PVA y concretamente bajo las condiciones no acuosas según Williamson en una atmósfera de nitrógeno seca (véanse Dolle F, Le Moigne J, Gramain P. Etherification de l'alcool polyvinyle-I. Reaction avec la propanesulfone. Eur. Polym. J. 1970; 6: 1227 y Gramain P, Le Moigne J. Etherification de l'alcool polyvinyle-II. Preparation de derives amphipatiques par alcoylation et sulfopropylat. Eur. Polym. J. 1972; 8: 703). (xx) significa el grado de sustitución de grupos OH en % en mol.

TABLA 1

Nombre	Peso molecular [kg/mol]	Grado de sustitución [%]	Sustituyente en -OH
PVA	~ 6 (*)	(20)	(-O-COCH ₃)
PVA	~ 15 (*)	(12)	(-O-COCH ₃)
SB03PVA	~ 16	3	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB10PVA	~ 19	10	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB20PVA	~ 23	20	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB30PVA	~ 27	30	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB40PVA	~ 31	40	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
SB50PVA	~35	50	-O-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
DEAE10PVA	~18	10	-O-(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂

* dato del fabricante

ES 2 345 182 T3

Se añadieron 2,4 g (0,1 moles) de hidruro de sodio purificado a 50 ml de DMSO seco a 20°C con enfriamiento en hielo con agitación hasta que ya no se observó más desprendimiento de gas. El carbanión obtenido de DMSO se mezcló gota a gota en el plazo de una hora con una disolución de 5 g de PVA en 100 ml de DMSO seco a TA. Después de una hora de reacción con enfriamiento en hielo se añadieron gota a gota 13,6 g (0,1 moles) de 1,4-butanosultona o 17,3 g (0,1 moles) de cloruro de N-(2-cloroetil)-N,N-dietil-amonio en 20 ml de DMSO seco en el plazo de 1,5 h. El producto se recogió en 70:30 (v/v) de acetona/hexano y se secó a vacío hasta constancia de peso. A continuación, el producto seco se purificó mediante ultrafiltración (Amicon 8010, membrana de filtración YM1).

Injerto en masa fundida para la preparación del vehículo según la invención mediante injerto de condensados de ácido alfa-hidroxicarboxílico en el poliol central. A modo de ejemplo para las lactonas de ácido láctico y ácido glicólico: D,L-lactida (LA: a partir de la escisión de agua intermolecular de 2 partes de ácidos lácticos) y glicolida (GA: correspondientemente a partir de ácido glicólico) se hicieron reaccionar en cantidades molares definidas, por ejemplo, 1:1, en presencia de cantidades definidas del poliol central, por ejemplo, 1% en peso de PVA, a, por ejemplo, 130°C durante, por ejemplo, tres horas bajo condiciones anhidras inertes con cantidades molares definidas de catalizador (por ejemplo, 0,2 mmoles de octoato de estaño). A continuación, el producto de reacción se recogió en un disolvente adecuado (diclorometano: DCM) y precipitó en un exceso 10:1 de un no disolvente de polímero miscible con el mismo (etanol) para la purificación y se secó a vacío hasta constancia de peso (Tabla 2).

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 345 182 T3

TABLA 2

Polímero	D,L-LA:GA [mol:mol]	Poliol central*/cantidad [% en peso]	Temp. de reacción [°C]	Disolvente
PVAPLG1	1:1	PVA/1	130	DCM
PVAPLG 10	1:1	PVA/10	130	Acetona
PVAPLG 33	1:1	PVA/33	140	Acetona/agua
PVAPLG 50	1:1	PVA/50	140	Agua
PVAPLG 57.1	1:1	PVA/57.1	140	Agua
PVAPLG 62.5	1:1	PVA / 62.5	140	Agua
PVAPLG 70	1:1	PVA170	140	Agua
PVAPLA5 0	1*:0 (*L- LA)	PVA/50	110	Agua
SB03PVA PLG10	1:1	SB03PVA/10	140	Acetona
SB10PVA PLG10	1:1	SB10PVA/10	140	Acetona
SB20PVA PLG10	1:1	SB20PVA/10	140	Acetona
SB30PVA PLG10	1:1	SB30PVA/1	140	Acetona
SB40PVA PLG10	1:1	SB40PVA/10	140	Acetona
SB50PVA PLG10	1:1	SB50PVA/10	140	Acetona
DEAE10 PVAPLG 10	1:1	DEAE10PVA/10	150	Acetona
SB40PVA	1:1	SB40PVA/33	140	Acetona/agua

ES 2 345 182 T3

Polímero	D, L-LA:GA [mol:mol]	Poliol central*/cantidad [% en peso]	Temp. de reacción [°C]	Disolvente
PLG33				
SB40PVA PLG50	1:1	SB40PVA/50	140	Agua
SB10PVA PLG45	1:1	SB10PVA/45	140	Agua
SB10PVA PLG50	1:1	SB10PVA/50	140	Agua

Tiempo de reacción respectivamente 3 horas, catalizador respectivamente octoato de estaño

* correspondientemente a la Tabla 1

Ejemplo 2

Caracterización de los polímeros

2.1 Cromatografía de exclusión por tamaño (CET) y dispersión de luz estática (DLE). Las disoluciones de polímero al 0,5% (m/V) se inyectaron en un sistema de cromatografía Merck-Hitachi termostático a 35°C (columnas: Lichrolog PS mix y Lichrogel PS 40, 10 µm) con refractómetro diferencial (RI71) y un detector de dispersión de luz MiniDawn (Wyatt Technology Corp.). (100 µl de células K5, longitud de onda de la luz láser 690 nm, potencia del láser 30 mW, detección a 45°C, 90°C y 135°C).

Ejemplo 3

Estudios de adhesión y captación de las nanopartículas en el modelo de cultivo celular. Descripción general del procedimiento. Determinación de experimentos celulares de citoadhesión y citotoxicidad

Un requisito para una administración mucosa también es, además de una baja acción tóxica en el tejido circundante (células epiteliales), un tiempo de permanencia suficientemente largo en las superficies mucosas (citoadhesión), así como una captación celular suficiente eventualmente necesaria. Para investigar la interacción con células mucosas se recurrió al modelo de cultivo de células Caco 2. Este modelo *in vitro* de la mucosa intestinal ya ha podido mostrar en muchas investigaciones su idoneidad para el estudio de resorción intestinal, citoadhesión y toxicidad de fármacos y sistemas de vehículos de fármacos.

Cultivo celular

Se cultivaron células Caco 2 de los pases 42 a 45 en medio de Eagle modificado por Dulbecco con un contenido de glucosa de 4,5 g/l con adición de 10% de suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM y 1% de aminoácidos no esenciales en atmósfera de CO₂ al 10% a 95% de HR y 37°C.

Investigaciones de toxicidad

Se sembraron células Caco 2 a una densidad celular de 6,5 x 10⁴ células/cm² en placas multipocillo de poliestireno. El cambio de medio se realizó cada 2 días. El día 21 después de la siembra, las células han formado una capa monocelular diferenciada y pueden utilizarse para investigaciones *in vitro*. Para esto, las células se lavaron 2x con disolución isotónica de cloruro sódico tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) y las suspensiones de coloides correspondientes según la invención (0,25, 2,5 mg/ml) se aplicaron sobre la superficie celular. Después de incubar durante varias horas (intervalos de tiempo según las figuras) se realizaron los ensayos de toxicidad mencionados a continuación.

- 1.) Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH): Principio: Como enzima citoplasmática, la LDH pasa al dañar la membrana citoplásmica del interior de las células al medio exterior (tampón) y puede cuantificarse mediante fotometría UV mediante procedimientos de determinación cinéticos frente a un patrón. Como patrón de referencia tóxico sirve Triton X 100 (al 0,1% en PBS) cuya liberación de LDH se corresponde con el 70%.

ES 2 345 182 T3

- 2.) Transformación de MTT (bromuros de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Principio: el compuesto de tetrazol MTT se reduce enzimáticamente en mitocondrias de células todavía viables en un colorante de formazano teñido de azul. La coloración azul es a este respecto proporcional a la viabilidad de las células y se registra fotométricamente, como referencia no tóxica sirve PBS.
- 3.) Principio de tinción con yoduro de propidio: el yoduro de propidio sólo atraviesa como sustancia hidrófila membranas celulares dañadas y se une a ácidos nucleicos del núcleo, por lo que en el caso de una excitación UV se produce una fluorescencia del núcleo roja que se registra microscópicamente. La evaluación se realiza mediante microscopía fluorescente con filtros de longitud de onda (380/550) frente a un patrón de PBS no tóxico.
- 4.) Citoadhesión y captación celular. Se sembraron células Caco 2 a una densidad celular de $6,5 \times 10^4$ células/cm² en membranas de policarbonato (Costar-Transwell). El cambio de medio se realizó cada 2 días. El día 21 después de la siembra, las células han formado una monocapa diferenciada y pueden usarse para investigaciones de adhesión y captación.
- 5.) Coloides marcados con fluorescencia con rojo Nilo (1% p/p), así como complejos de polímero-principio activo (principio activo: albúmina de suero bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA)) se aplicaron a la superficie apical de las células y se incubaron durante 120 min a 37°C, 95% de HR, 10% de CO₂. La concentración de coloides ascendió en ambos casos a 250 pg/ml. Después de la incubación, las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS y a continuación se fijaron durante 60 min con disolución de formalina (al 4% en PBS). Las membranas de filtración se cortaron mediante un escalpelo y se incorporaron en glicerol-gelatina. Los preparados así preparados se investigaron mediante microscopía de barrido láser confocal (MBLC) para fluorescencia adhesiva e intracitoplasmática.

En los controles, sólo con principio activo sin coloides o complejos no pudo detectarse fluorescencia sobre o en las células.

Ejemplo 4

Ratones Balb/c hembra, 7-9 semanas de edad, peso 16-22 (que pueden obtenerse en Harlan-Winkelmann, Marburgo, Alemania). Se utilizaron comparativamente 5 grupos. Las dispersiones de coloides se compararon tanto con toxoides del tétanos (Ttx) absorbidos en alúmina como también libres convencionales. Los ratones se aleatorizaron, se agruparon en grupos de 10 animales y se inmunizaron en tres semanas consecutivas (día 1, 8, 15) por administración peroral (p.o.) de 200 µl de 5LF de Ttx que contenían los polielectrolitos coloidales. La inoculación i.p. (200 µl de Tetanol™) se realizó en un control positivo. Una reducción se realizó en la semana 0 y 4. Todos los sueros se realizaron en el ensayo ELISA para anticuerpos IgG y IgA específicos para Ttx. La serie de dilución se realizó en placas de 6 microtítulos de TTF recubiertas. Los anticuerpos específicos para Ttx se cuantificaron en la incubación con IgG o IgA anti-ratón de cabra conjugadas con peroxidasa específica de cadena pesada (medición a (DO) 450 nm en la incubación con TMB). Los resultados se evaluaron como títulos de suero de punto final recíprocos con la mayor dilución de suero dada: valor de DO 0,2.

La bioadhesión en el ratón se investigó mediante el toxoide del tétanos (Ttx) como antígeno modelo. Se administraron tres dosis de 5 LF del Ttx por vía oral en el transcurso de tres semanas (n=10).

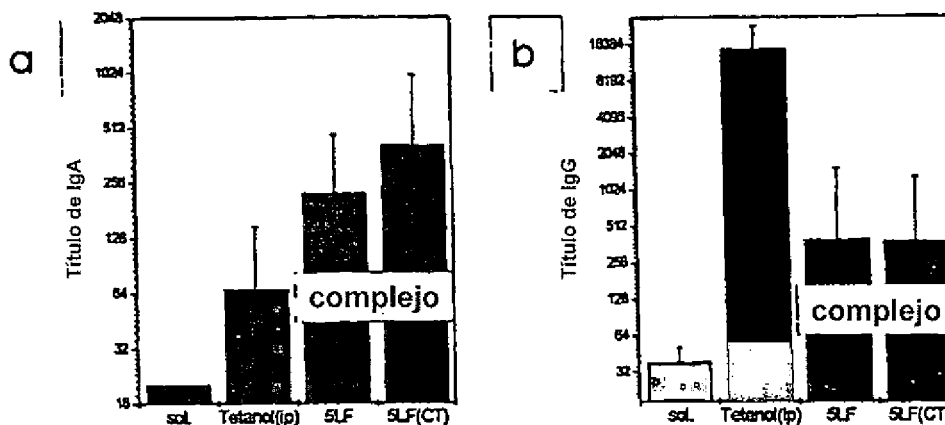


Figura: Título de IgG y IgA después de la administración por vía oral de distintas formulaciones de toxoides del tétanos. Se alcanzó un título de IgA de 4 a 6 veces mayor con el vehículo coloidal en comparación con Tetanol, que muestra impresionantemente una actividad mucosa aumentada.

Tabla 3: Polímeros en peine cargados / sin cargar (sin embargo, sólo son importantes los solubles en agua)

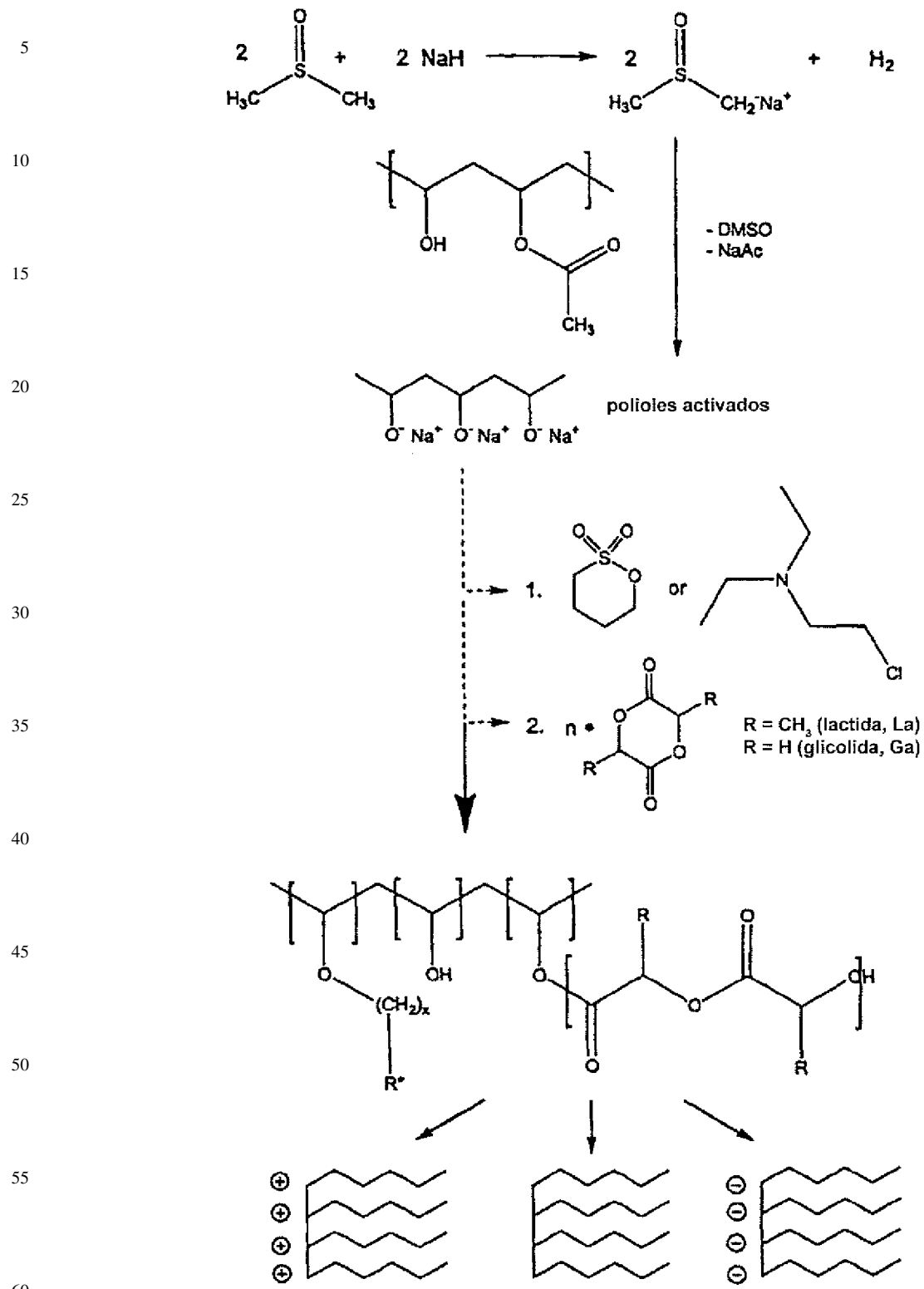
N°	Polímero	PVA DS a) [%]/[% en masa]	Mw del esqueleto a) [g/mol]	Mn de la cadena de PLG b) [g/mol]	Unidades de PLG por cadena b)	Mn del polímero b) [g/mol]	LA:GA b) [mol%]	Disolvente
1	PVA-g-PLGA	-	15.000	4000	32	1.250.000	51 : 49	Diclorometano
2	PVA-g-PLGA	-	15.000	1100	9	360.000	51 : 49	1:1 (DCM : acetona)
3	PVA-g-PLGA	-	15.000	590	5	238.000	50 : 50	Acetona
4	PVA-g-PLGA	-	15.000	390	3	134.000	50 : 50	Acetona
5	PVA-g-PLGA	-	15.000	(50) *	(0,8) *	(30.000) *	(50:50) *	Agua
6	PVA-g-PLGA	-	15.000	(37) *	(0,4) *	(26.000) *	(50:50) *	Agua
7	PVA-g-PLGA	-	15.000	(30) *	(0,3) *	(24.000) *	(50:50) *	Agua
8	PVA-g-PLGA	-	15.000	(21) *	(0,2) *	(21.000) *	(50:50) *	Agua
9	P(SB-VA) - g-PLGA	14/S=6,8	19.900	590	5	172.000	53 : 47	Acetona
10	P(SB-VA) - g-PLGA	14/S=6,8	199'900	(50) *	(0,4) *	(33.000) *	(50:50) *	Agua
11	P(SB-VA) - g-PLGA	27/S=10,0	26.000	840	7	210.000	52 : 48	Acetona

N°	Polímero	PVA DS a) [%]/[% en masa]	Mw del esqueleto a) [g/mol]	Mn de la cadena de PLG b) [g/mol]	Unidades de PLG por cadena b)	Mn del polímero b) [g/mol]	LA:GA b) [mol%]	Disolvente
12	P(SB-VA) - g-PIGA	27/S=10,0	26.000	(120)*	(2)*	(52.000)*	(50:50)*	1:1 (agua : acetona)
13	P(SB-VA) - g-PIGA	27/S=10,0	26.000	(60)*	(0,5)*	(35.000)*	(50:50)*	Agua
14	P(SB-VA) - g-PIGA	43/S=12,3	33.600	1100	9	221.000	53 : 47	Acetona
15	P(SB-VA) - g-PIGA	43/S=12,3	33.600	(80)*	(0,6)*	(35.000)*	(50:50)*	Agua

a) = a partir de análisis elemental b) = a partir de RMN según procedimientos estándar

ES 2 345 182 T3

Esquema de reacción 1 de los Ejemplos



REIVINDICACIONES

5 1. Vehículo nanoparticulado coloidal que contiene un polímero en peine soluble en agua, en el que el polímero en peine soluble en agua contiene una columna vertebral de al menos un poliol soluble en agua, así como cadenas laterales hidrófobas con formación de un carácter anfífilo y dado el caso grupos iónicos, en el que el polímero de columna vertebral alcanza un peso molecular medio (M(w)) de 10.000-30.000 g/mol y junto con cadenas laterales hidrófobas correspondientemente un peso molecular medio (M(w)) de preferiblemente 45.000-100.000 g/mol, y en el que los vehículos presentan un tamaño de 10 a 800 nm.

10 2. Vehículo nanoparticulado coloidal según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el poliol soluble en agua se selecciona del grupo polisacáridos, polialcohol, poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo) y dextrans.

15 3. Vehículo nanoparticulado coloidal según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la cadena lateral hidrófoba se selecciona del grupo polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida) y politartratos.

20 4. Vehículo nanoparticulado coloidal según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el polímero de columna vertebral (M(w)) alcanza un peso molecular medio de 15.000-25.000 g/mol y preferiblemente 20.000 g/mol, y junto con cadenas laterales hidrófobas correspondientemente un peso molecular medio (M(w)) de 50.000-80.000 g/mol y con especial preferencia 50.000-60.000 g/mol.

5. Vehículo nanoparticulado coloidal según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque éste induce en la mucosa una respuesta inmunitaria sistémica.

25 6. Uso de un vehículo nanoparticulado coloidal según una de las reivindicaciones 1 a 5 que contiene al menos un polímero en peine soluble en agua para administración mucosa.

30

35

40

45

50

55

60

65