



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 366 255**

② Número de solicitud: 201131074

⑤ Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C08B 37/08** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **27.06.2011**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**18.10.2011**

⑦ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
Edificio EMPRENDIA - Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Alonso Fernández, María José;  
Sánchez Barreiro, Alejandro y  
Vicente Ozores, Sara**

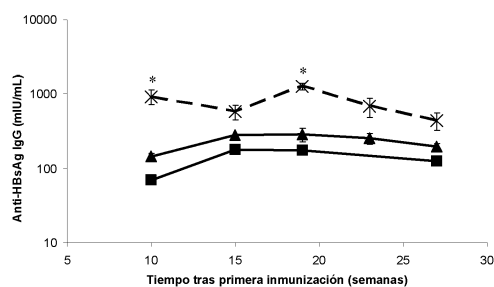
⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Nanocomposiciones sacarídicas para la liberación de vacunas.**

⑦ Resumen:

Nanocomposiciones sacarídicas para la liberación de vacunas. La presente invención se refiere a un sistema para la administración de antígenos, que comprende un sistema de nanocápsulas de un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden a su vez: a) poli-D-glucosamina; b) al menos un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos; c) al menos un tensioactivo, preferiblemente de tipo aniónico o de tipo no iónico; d) al menos un antígeno, preferiblemente de tipo viral; y opcionalmente e) una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladoras; caracterizadas porque presentan una estructura característica tipo reservorio donde los componentes lipídicos forman un núcleo oleoso que se encuentra recubierto por al menos un polisacárido catiónico. Adicionalmente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho sistema de nanocápsulas así como a procedimientos para su preparación y usos del mismo.

Figura 7



ES 2 366 255 A1

**DESCRIPCIÓN**

Nanocomposiciones sacarídicas para la liberación de vacunas.

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere al desarrollo de formulaciones basadas en el diseño de vehículos nanométricos, capaces de inducir o potenciar una repuesta inmunológica frente a un antígeno asociado. Más en concreto, se refiere a nanosistemas de aplicación en el campo de las enfermedades infecciosas. Adicionalmente, la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que los comprenden, así como a procedimientos para su preparación.

**Antecedentes**

Las vacunas se componen tradicionalmente de microorganismos atenuados o muertos que son capaces de generar protección inmunológica frente a la enfermedad que causan una vez inoculados al organismo. El éxito de este tipo de vacunas reside en que el organismo reconoce dicho patógeno y comienza una respuesta inmunitaria frente al mismo, así como la generación de memoria inmunológica, lo que permite desencadenar una respuesta inmediata cuando el microorganismo patógeno entra en el organismo. Sin embargo, la utilización de este tipo de vacunas puede ir acompañada de cierta problemática relacionada principalmente con (i) la posible reactivación del agente infeccioso como consecuencia de mutaciones en el genoma, (ii) la presencia de agentes tóxicos que pueden acompañar al patógeno como son los lipopolisacáridos (LPS), o (iii) la pérdida de potencia debido a deficiencias en el transporte y almacenamiento en las condiciones de refrigeración requeridas (Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. Nat Med 2005;11(4 (suppl)):S5-11).

Para solventar algunos de estos problemas, en los últimos años se han obtenido antígenos subunidad formados por las partes mejor conservadas de los patógenos, o plásmidos ADN codificadores de estos antígenos, para que el organismo pueda reconocerlos como invasores una vez administrados, y que presentan un mejor perfil de seguridad al evitar la inoculación del microorganismo entero. Sin embargo, este aumento en la seguridad de la vacuna suele conllevar una disminución en la inmunogenicidad de la misma, lo que da lugar a una menor potencia de la respuesta inmune generada. Por esta razón, tanto los antígenos subunidad como las vacunas ADN requieren (i) una dosificación múltiple con dosis de recuerdo para asegurar la protección inmunológica, así como (ii) el apoyo de algún tipo de agente adyuvante, de forma que ayude a la inducción y potenciación de la respuesta inmunitaria frente al antígeno/material genético administrado, y por tanto, frente al propio patógeno.

Actualmente, sólo las sales insolubles de aluminio (álum) están aprobadas por las agencias regulatorias de todo el mundo, y las únicas por la FDA (US Food and Drug Administration), para su uso en humanos con este fin. Sin embargo, se han identificado múltiples inconvenientes relacionados con este adyuvante, tales como:

- aparición de síntomas locales tras la inyección como hinchazón, eritemas o nódulos cutáneos (Lindbald EB. Aluminium adjuvants - in retrospect and prospect. Vaccine 2004;22:3658-3668),
- pérdida de potencia por congelación accidental (Zapata MI, Peck GE, Hem SL, White JL, Feldkamp JR. Mechanism of freeze-thaw instability of aluminum hydroxycarbonate and magnesium hydroxide gels. J Pharm Sci 1984;73:3-9),
- inducción de una respuesta inmune únicamente de tipo humoral, lo que lo hace menos adecuado para aquellos microorganismos que requieran una respuesta celular para ser eliminados del organismo (Brewer JM. (How) do aluminiun adjuvants work? Immunol Lett 2006;102:10-15),
- aparición de reacciones alérgicas (Brewer JM. (How) do aluminiun adjuvants work? Immunol Lett 2006;102:10-15),
- necesidad de administrarlo por vía parenteral y en varias dosis para generar protección.

Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de nuevos sistemas que sean menos tóxicos, más tolerables por el paciente, que permitan la potenciación y modulación de las respuestas inmunes frente a una amplia variedad de microorganismos patógenos, así como una reducción en el número de dosis necesaria para alcanzar protección frente a enfermedades infecciosas.

Nuevos sistemas basados en lípidos y tensioactivos (emulsiones) han sido introducidos recientemente en el mercado europeo formando parte de vacunas frente a la gripe pandémica: MF59<sup>TM</sup>, AS03<sup>TM</sup> y la AF03<sup>TM</sup>, desarrollados respectivamente por las empresas farmacéuticas Novartis, GlaxoSmithKline (GSK) y Sanofi Pasteur (EMEA - pandemic influenza vaccines: <http://tinyurl.com/5vw5yyn>):

- MF59<sup>TM</sup> (Novartis): Aflunov<sup>®</sup> (H5N1), Focetricia<sup>®</sup> (H1N1), Foclivia<sup>®</sup> (H5N1)
- AS03<sup>TM</sup> (GSK): Prepandrix<sup>®</sup> (H5N1)
- AF03<sup>TM</sup> (Sanofi Pasteur): Humenza<sup>®</sup> (H1N1).

## ES 2 366 255 A1

Dichas composiciones basadas en emulsiones se han aprobado como vehículos adyuvantes de virus inactivados provenientes de diversas cepas de influenza relacionadas con el brote pandémico. Su aplicación como vehículos adyuvantes de antígenos subunidad no ha sido aprobada por las agencias regulatorias, aunque se encuentra recogida en numerosos documentos (por ejemplo: US2009191226 (A2), US2009304742 (A1), WO 2010125461 (A1), US 2005136073 (A1), WO 2007006939 (A3), WO 0168129 (A2)). Las emulsiones adyuvantes descritas en dichos documentos presentan una composición común consistente en una fase oleosa compuesta por escualeno y una mezcla de distintos tensioactivos no iónicos que le confieren estabilidad al sistema. Dichas emulsiones pueden incluir además agentes antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol (por ejemplo: WO 2006100110 (A1), WO 2009127676, WO 2009127677, US 2010183667 (A1)) u otras moléculas inmunomoduladoras como el CpG (por ejemplo: EP 1572124 (A4)), muramilo dipéptidos (por ejemplo: US2003147898 (A1), EP0315153 (A2)), monofosforil lípido A (por ejemplo: WO 9956776 (A2), EP1951298 (A1)) ó también éste último combinado con QS21 (por ejemplo: US 2007196394 (A1), WO 9517210 (A1)).

También se han descrito composiciones constituidas de un núcleo oleoso rodeado de una cubierta polimérica, llamados sistemas nanocapsulares, entre los que cabe mencionar una composición de nanocápsulas polisacáridicas (EP1834635 A1). Este sistema emplea en el núcleo oleoso aceites compuestos por ácidos grasos y sus derivados (ésteres ó amidas) y además requiere la presencia de un compuesto polioxialquileno para estabilizar el sistema.

### Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un sistema al cual es posible asociar antígenos subunidad de forma eficaz que presenta ventajas especialmente relevantes en el campo de las vacunas: está compuesto de materiales considerados biocompatibles y asimilables por el organismo, y permite alcanzar niveles de protección en animales comparables a los que resultan protectores en humanos frente a enfermedades infecciosas, empleando un número de dosis de antígeno más reducido que en el caso de las vacunas que se comercializan actualmente.

Así, en un primer aspecto, la invención se dirige a un sistema para la administración de antígenos que comprende nanocápsulas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden:

- a) poli-D-glucosamina;
- b) un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos;
- c) al menos un agente tensioactivo excluyendo tensioactivos catiónicos; y
- d) al menos un antígeno;

caracterizadas por presentar una estructura tipo reservorio, donde el núcleo está compuesto por componentes lipídicos y está recubierto por poli-D-glucosamina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema como se ha definido anteriormente que se encuentra en forma liofilizada.

En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna que comprende un sistema como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un sistema como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto, la invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende un sistema como se ha definido anteriormente para su uso en la prevención de enfermedades infecciosas.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido anteriormente que comprende:

- a) preparar una solución acuosa de poli-D-glucosamina;
- b) preparar una solución orgánica formada por al menos un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos y al menos un agente tensioactivo;
- c) emulsificar las soluciones formadas en a) y b) con la formación espontánea de las nanocápsulas;
- d) incubar al menos un antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas preformadas.

Alternativamente, el procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido anteriormente comprende:

- a) preparar una solución acuosa de poli-D-glucosamina;

- b) preparar una solución orgánica formada por al menos un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos y al menos un agente tensioactivo;
- c) emulsificar la solución b) en una fase acuosa;
- d) incubar la nanoemulsión obtenida en c) con la solución a);
- e) incubar al menos un antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas preformadas.

La invención hace referencia asimismo al uso de un sistema como se ha definido anteriormente en la preparación de una vacuna. En una realización particular, dicha vacuna es para aplicación en prevención de enfermedades infecciosas. Preferiblemente las enfermedades infecciosas a las que va dirigida la prevención son aquellas causadas por agentes víricos.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) donde se puede observar la morfología de las nanocápsulas sin antígeno asociado (rHBsAg). Las nanocápsulas presentan una forma regular esférica y tamaño de partícula nanométrico homogéneo.

Figura 2: Imágenes de fluorescencia *in vivo* tras la administración intramuscular de nanocápsulas con núcleo de escualeno, elaboradas a partir de poli-D-glucosamina marcada con Alexa Fluor 750 succinimidil éster. Las nanocápsulas son capaces de formar un depot en el lugar de inyección que permanece durante al menos 5 horas tras la inyección.

Figura 3: Imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) donde se puede observar la morfología de las nanocápsulas con el rHBsAg asociado a su superficie. Dichas nanocápsulas presentan una forma regular esférica y tamaño de partícula nanométrico homogéneo.

Figura 4: Las nanocápsulas con o sin antígeno asociado (rHBsAg) han sido liofilizadas con diferentes concentraciones de trealosa como agente crioprotector. En esta gráfica se puede apreciar que tras la resuspensión del polvo liofilizado es posible recuperar el tamaño de partícula de la suspensión inicial.

Figura 5: Las nanocápsulas con núcleo de escualeno son capaces de generar una respuesta inmunitaria protectora frente a hepatitis B (comparable a los niveles protectores descritos para humanos) tras la administración de dos (0 y 4 semanas) ó tres dosis (0,4 y 8 semanas) de 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado, por vía nasal. Se puede observar en esta figura la importancia de una tercera dosis por vía mucosa para generar niveles mayores de inmunoglobulinas específicas.

Figura 6: El efecto adyuvante de las nanocápsulas se ha probado tras la administración de dos dosis de 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado por vía intramuscular (0 y 4 semanas). La concentración de anticuerpos frente a este antígeno alcanzada por las distintas formulaciones de nanocápsulas se prolonga durante el tiempo de estudio (6 meses) y en ambos casos se consiguen niveles significativamente mayores con ambos sistemas (nanocápsulas con núcleo de escualeno (■) o núcleo de escualeno e imiquimod (▲)) que la formulación de referencia de la vacuna (rHBsAg-alum (-X-)) a la misma dosis. La diferente composición del núcleo da lugar a una diferencia en la cinética de inducción de la respuesta inmune de ambos nanosistemas. \*Nanocápsulas polisacarídicas vs. rHBsAg-alum  $p < 0.05$ .

Figura 7: La administración en una dosis única de 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado a las nanocápsulas polisacarídicas (con núcleo de escualeno (■) o núcleo de escualeno e imiquimod (▲)) ha generado niveles seroprotectores de IgG (>10 mIU/mL, descritos para humanos: Shouval D. Hepatitis B vaccines. J Hepatol 2003;39: S70-76) que se prolongan durante un largo período de tiempo (6 meses), no siendo éstos estadísticamente diferentes a los generados por rHBsAg-alum (-X-) administrado en dos dosis de 10  $\mu$ g (0 y 4 semanas). En este caso, la composición del núcleo oleoso de las nanocápsulas (escualeno o escualeno e imiquimod) no influye en la magnitud o en la cinética de la respuesta inmune. \*Nanocápsulas polisacarídicas vs. rHBsAg-alum  $p < 0.05$ ).

### Descripción detallada de la invención

En la presente invención, por el término “nanocápsulas” se hace referencia a estructuras estables y de características homogéneas, reproducibles y modulables perfectamente diferenciables, que se forman como consecuencia de un proceso controlado de interacción electrostática entre el núcleo oleoso dotado de un potencial zeta negativo y una cubierta catiónica. La interacción que resulta entre los diferentes componentes de las nanocápsulas genera entidades físicas características, que son independientes y observables, cuyo tamaño medio es inferior a 1  $\mu$ m, es decir, un tamaño medio de entre 1 y 999 nm.

Por el término “tamaño medio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanocápsulas, que comprende la estructura compuesta por el núcleo hidrofóbico y la cubierta polisacarídica, que se mueve junta en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por un experto en la técnica.

Las nanocápsulas del sistema de la invención tienen un tamaño de partícula medio inferior a  $1\ \mu\text{m}$ , es decir, tienen un tamaño medio de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 50 y 800 nm. En una realización particular el tamaño medio está comprendido entre 150 nm y 350 nm. El tamaño medio de las nanocápsulas está influido principalmente por su composición y las condiciones de formación.

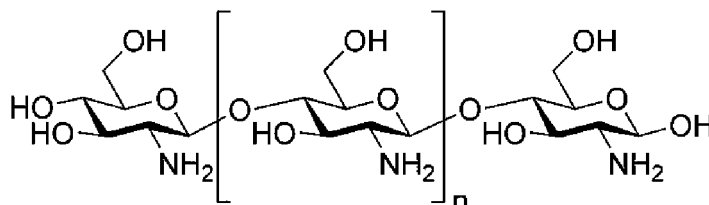
Por otra parte, las nanocápsulas pueden presentar una carga eléctrica (medida mediante el potencial  $\xi$ ), cuya magnitud puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de la proporción de los diferentes componentes en el sistema. En una realización particular de la invención, las nanocápsulas presentan carga positiva que puede variar entre +1 mV y +75 mV. En una realización particular, la carga está comprendida entre +25 mV y +67 mV.

El potencial  $\xi$  de los sistemas de la invención puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por un experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental de la presente memoria descriptiva.

#### *Poli-D-glucosamina*

La cubierta de poli-D-glucosamina que rodea un núcleo oleoso proporciona ventajas a la presente invención. Por un lado, dicha cubierta ofrece la posibilidad de asociar el antígeno al sistema mediante interacciones electrostáticas. Por otro lado, la cubierta de poli-D-glucosamina también tiene un papel importante en la inducción y potenciación de la respuesta inmune ya que se le han descrito propiedades inmunoadyuvantes (Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Scholm J, Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 2007;25:2085-94). Además, las características superficiales dadas por la cubierta de poli-D-glucosamina, junto con el tamaño nanométrico del sistema, ofrecen ventajas para la inmunización a través de vías mucosas, por ejemplo la vía nasal, mejorando el transporte a través de la barrera mucosa de las moléculas bioactivas asociadas.

En la presente invención, se entiende por el término "poli-D-glucosamina" un homopolímero formado por subunidades de D-glucosamina unidas mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4), así como sus sales, fragmentos o derivados. En términos generales, se obtiene a partir de la quitina que está compuesta por subunidades de N-acetil-D-glucosamina y es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos y del exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, insectos). La poli-D-glucosamina que se encuentra disponible comercialmente se obtiene mediante hidrólisis alcalina de la quitina, lo que da lugar a la eliminación de los grupos aceto de dicha molécula (desacetilación) dejando libres los grupos amino primarios. De esta forma, la desacetilación completa de la quitina da lugar a la obtención del homopolímero poli-D-glucosamina, representado en la figura inferior.



Los grupos amino primarios de los monómeros de D-glucosamina son capaces de protonarse en medio ácido, lo que le confiere a este polisacárido su carácter catiónico y en consecuencia sus características especiales de hidrosolubilidad y bioadhesión. Por otro lado, se trata de un material de indudable interés en el campo farmacéutico y cosmético, por ser biocompatible y biodegradable, cuyos productos de degradación no son tóxicos (Fini A, Orienti I. The role of chitosan in drug delivery. *Am J Drug Deliv* 2003;1:43).

En el contexto de la presente invención, los derivados de poli-D-glucosamina incluyen derivados que presentan diferentes grados de acetilación (porcentaje de subunidades de D-glucosamina acetiladas), como son los quitosanos. Estos derivados se pueden conseguir mediante la modulación de la reacción de desacetilación de la quitina, de forma que se pueden dejar libres en mayor o menor medida los grupos amino primarios. Otro procedimiento descrito en la literatura se refiere a reacciones de reacetilación de la molécula de poli-D-glucosamina (Lamarque G, Viton C, Domard A. Comparative study of the second and third heterogenous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. *Biomacromolecules* 2004;5(5):1899).

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, se puede emplear poli-D-glucosamina con un amplio intervalo de pesos moleculares, sin que este parámetro influya significativamente en la formación de las nanocápsulas.

El término poli-D-glucosamina tal y como se utiliza en la presente descripción incluye este polisacárido como base o como sal ácida, ésta última formada normalmente por ácidos inorgánicos u orgánicos como por ejemplo el ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido cítrico ó ácido ascórbico. En una realización preferida de la invención, la sal ácida utilizada es el clorhidrato.

## ES 2 366 255 A1

### *Aceite adyuvante*

El empleo de aceites adyuvantes es crítico en los sistemas de la presente invención ya que se liberan de forma simultánea a los antígenos asociados y se consigue un efecto sinérgico sobre las células diana, en este caso células del sistema inmunitario.

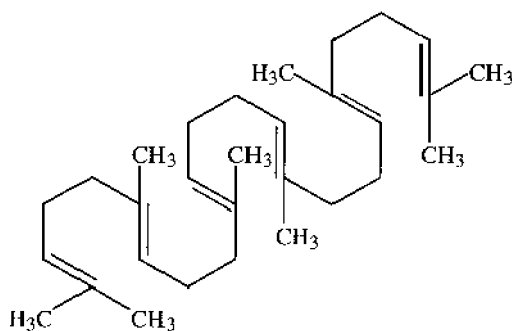
Por el término “aceite adyuvante” se entiende cualquier aceite, es decir, líquido graso de diversos orígenes que no se disuelve en el agua y que tiene menor densidad que ésta, caracterizado por presentar propiedades estimulantes sobre las células del sistema inmunitario. De entre los posibles aceites adyuvantes se seleccionan aquellos que poseen una estructura de isoprenoide, terpeno o terpenoide.

El término “terpeno” se refiere a hidrocarburos de origen biológico que tienen un esqueleto carbonado formado por unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno); esta clase de compuestos se subdivide según el número de átomos de carbono en hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40, carotenoides) y politerpenos. El término “isoprenoide” se refiere a compuestos formalmente derivados de unidades de isopreno que difieren de la estricta adición de unidades de isopreno mediante pérdida, fragmentación, derivatización o modificación química, como por ejemplo metilación o saturación de los dobles enlaces. El término “terpenoide” se refiere a terpenos o isoprenoides que contienen al menos un oxígeno en su estructura, dicho oxígeno puede estar presente por ejemplo en grupos funcionales; esta clase de compuestos se subdivide según el número de átomos de carbono del mismo modo que los terpenos. En las estructuras de terpenos, isoprenoides y terpenoides, el esqueleto de unidades de isopreno pueden ser estructuras lineales o presentar diferentes estructuras cíclicas en alguno de los extremos o en ambos extremos lo cual se indica mediante letras griegas según la nomenclatura de la IUPAC.

En una realización preferida el aceite adyuvante se selecciona de entre el grupo consistente en vitamina A, vitamina E, escualeno y escualano.

En una realización preferida, el aceite es escualeno.

El escualeno es un hidrocarburo poliinsaturado cuya estructura se puede observar en la siguiente figura:



Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza ya que todos los organismos complejos producen escualeno, incluido los humanos. Se trata del precursor inicial en la ruta de síntesis de colesterol. Para su uso comercial se extrae principalmente del aceite de hígado del tiburón, aunque también puede tener origen vegetal por ejemplo obtenido a partir de aceite de oliva y hojas de olivo, aceite de germen de trigo o aceite arroz.

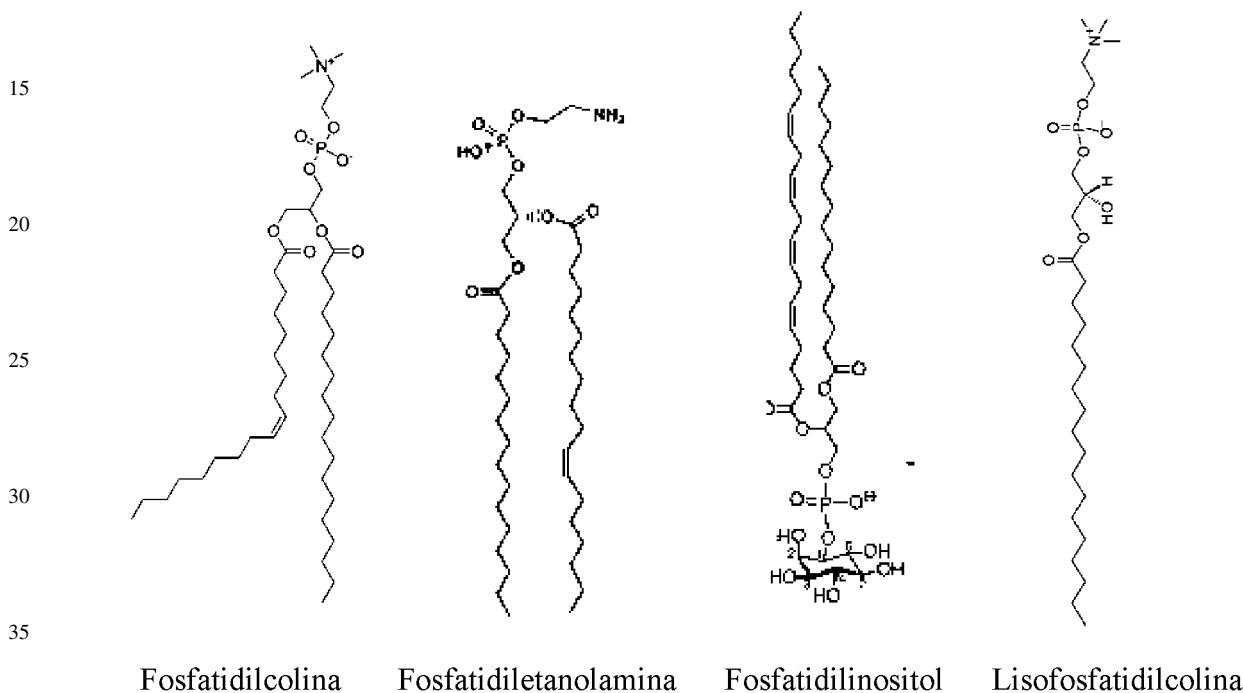
### *Agente tensioactivo*

Se entiende como “agente tensioactivo” cualquier molécula compuesta de una parte hidrófoba y un resto hidrófilo. Estas moléculas presentan, por tanto, propiedades anfifílicas, lo que hace que en una mezcla agua/aceite, éstas migren hacia la superficie entre el agua y la fase oleosa. Así, la cabeza hidrofílica se mantiene en la fase acuosa y la cola hidrófoba interacciona con el aceite alterando las propiedades superficiales de la interfaz agua/aceite y permitiendo la formación de una emulsión, así como su estabilización.

En una realización particular, el agente tensioactivo puede pertenecer al grupo de los tensioactivos de tipo aniónico o de tipo no iónico. En otra realización particular, el agente tensioactivo puede estar formado por mezclas de tensioactivos de tipo aniónico y/o de tipo no iónico.

En una realización particular, el tensioactivo es de tipo aniónico. En otra realización particular, el tensioactivo aniónico es un compuesto fosfolípídico. Los fosfolípidos son un tipo de lípidos anfipáticos compuestos por una molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos como colina, serina o etanolamina y que habitualmente poseen una carga

eléctrica. En una realización particular el compuesto fosfolípido es lecitina. La lecitina se conoce como una mezcla de distintos fosfolípidos en diversas proporciones. El fosfolípido mayoritario en la lecitina es la fosfatidilcolina, aunque también contiene otros fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y lisofosfatidilcolina, representados en la figura inferior. La proporción de los diferentes fosfolípidos en la composición de la lecitina depende principalmente de la fuente de obtención, así como del proceso de purificación y separación de los compuestos. Así, la lecitina puede tener un origen animal si se extrae por ejemplo de la yema del huevo, aunque lo más habitual es que el origen sea vegetal, siendo la principal fuente las judías de la planta de soja. Otras fuentes de obtención de lecitinas vegetales son también otras semillas oleosas como las de colza, girasol y maíz. Además, existen también fosfolípidos obtenidos mediante síntesis química. En una realización particular de la invención, el origen de la lecitina utilizada es la planta de la soja.



En otra realización particular, el agente tensioactivo de tipo no iónico se selecciona entre aquellos tensioactivos de este tipo de grado farmacéutico seleccionados del grupo compuesto por derivados hidroxílicos de cadena larga de 8 a 18 átomos de carbono (alcoholes grasos), ácidos carboxílicos etoxilados, amidas etoxiladas, glicéridos etoxilados, ésteres de glicol y derivados, monoglicéridos, poligliceril ésteres, ésteres y éteres de polialcoholes, ésteres de sorbitán/sorbitol, triésteres del ácido fosfórico, derivados etoxilados de los alcoholes grasos y éteres de polietilenglicol.

En una realización particular, el sistema de la invención comprende nanocápsulas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden poli-D-glucosamina, lecitina, escualeno y al menos un antígeno.

*Antígeno*

Los sistemas de la invención permiten la liberación del antígeno simultáneamente a los componentes adyuvantes que conforman el núcleo oleoso, con la finalidad de ejercer un efecto sinérgico sobre las células diana, en este caso células del sistema inmunitario.

Por el término “antígeno”, se entiende cualquier macromolécula de naturaleza proteica, peptídica, polisacáridica, lipídica o formada por combinaciones de éstas, que forma parte de componentes estructurales de microorganismos patógenos y que son capaces de generar una respuesta inmune adaptada una vez administrados, para dar lugar a una protección inmunológica frente a dicho patógeno.

En una realización particular, el antígeno es un antígeno de origen viral. En otra realización particular, el antígeno de origen viral se selecciona de entre el grupo consistente en antígenos subunidad característicos de virus de la hepatitis A, B, C ó E, virus del papiloma humano, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (por ejemplo, proteínas gp120, gp41, gp36, p24), virus de la influenza (por ejemplo, proteínas HA, NP, NA, ó M), citomegalovirus, virus del herpes simple, SARS coronavirus, rotavirus, virus sincicial respiratorio, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubeola, virus de Epstein-Barr, virus del dengue y virus de la varicela Zoster. En una realización particular, el antígeno seleccionado es un antígeno subunidad característico del virus de la hepatitis B. Concretamente, se trata del antígeno recombinante de superficie de la hepatitis B (rHBsAg).

## ES 2 366 255 A1

La proporción de antígeno asociado a las nanocápsulas puede ser de hasta el 95% con respecto al peso total de la poli-D-glucosamina. Aunque, la proporción de antígeno se podrá adecuar a las necesidades del caso particular y teniendo en cuenta la dosis que se precise administrar. En una realización particular, la proporción del antígeno se encuentra entre el 1 y el 50% en peso con respecto a la poli-D-glucosamina. En una realización particular, la proporción del antígeno se encuentra entre el 1 y el 25% en peso con respecto al polisacárido.

### *Molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras*

El sistema de la presente invención, compuesto por un núcleo hidrofóbico y una cubierta hidrofílica, permite la incorporación de ingredientes adicionales que contribuyen a potenciar o modular la respuesta inmune. De este modo, además del efecto propio del aceite adyuvante que conforma el núcleo de las nanocápsulas, es posible incorporar un agente inmunoestimulante o inmunomodulador en el núcleo o asociado a la cubierta polisacáridica, de forma que se consiga una liberación simultánea con el antígeno asociado a la superficie del mismo vehículo en las células del sistema inmune, sobre las cuales se va ejercer la acción preventiva. Con esta estrategia se genera un efecto sinérgico de los componentes con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladores que forman las nanocápsulas una vez capturadas por las células inmunocompetentes, y se potencia y/o modula la respuesta inmune específica frente al antígeno asociado.

Así, en una realización particular, los sistemas de la invención descritos previamente comprenden adicionalmente una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladoras.

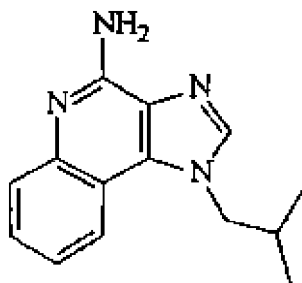
Por “molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras” se entiende cualquier molécula, con actividad preventiva o terapéutica reconocida, capaz de ejercer una acción estimuladora, moduladora o ambas sobre las células del sistema inmunitario y por tanto capaz de inducir, potenciar o modular una respuesta inmune específica frente al antígeno que acompañan.

En una realización particular, dicha molécula bioactiva puede ser de carácter hidrofílico o hidrofóbico, de forma que pueda asociarse al vehículo sobre la cubierta polisacáridica o en el núcleo oleoso, respectivamente.

En una realización particular, la molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladoras de carácter hidrofílico se selecciona del grupo consistente en ARN de doble cadena, ARN de cadena única, flagelina, poly(dT), CpG ODNs, tri-DAP, iE-DAP, IC31, citoquinas y toxinas bacterianas. En una realización particular el ARN de doble cadena es poly-I:C o poly-A:U. En una realización particular el ARN de cadena única se selecciona entre ORN02, ORN06, ssRNA40, ssRNA41, ssRNA-DR y ssPolyU. En una realización particular las citoquinas se seleccionan entre IL-2, IL-12, IL-15 y IFN- $\gamma$ . En una realización particular las toxinas bacterianas son la toxina colérica (CT) o la enterotoxina LT de *Escherichia coli* (LTK63).

En una realización particular, la molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladores es de carácter hidrofóbico. En otra realización particular, la molécula bioactiva se selecciona de entre el grupo consistente en un compuesto lipopolisacárido (LPS), monofosforil lípido A, imidazoquinolinas, saponinas, muramil-dipeptidos (MDP) y lipopéptidos. En una realización particular, las imidazoquinolinas son resiquimod, gardiquimod o imiquimod. En una realización particular, la saponina es quilaja A o QS21. En una realización particular, el lipopéptido es Pam3Cys.

En una realización particular, la molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras es imiquimod, cuya fórmula se representa en la figura inferior.



El imiquimod pertenece al grupo de las imidazoquinolinas y actúa como agente estimulante y modulador de las células del sistema inmune innato por acción agonista directa sobre el receptor intracelular TLR 7 (Toll-like receptor 7), el cual se encuentra asociado a la membrana de endosomas presentes en el citoplasma de las células del sistema inmunitario. Por tanto, la activación de dicho receptor por el imiquimod permite amplificar y modular la respuesta inmune específica frente al antígeno que acompaña.



## ES 2 366 255 A1

En una realización particular, el sistema de la invención comprende nanocápsulas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden poli-D-glucosamina, lecitina, escualeno, imiquimod y al menos un antígeno. En otra realización particular, el antígeno es un antígeno subunidad característico del virus de la hepatitis B.

5 En otra realización particular, el sistema de nanocápsulas de la presente invención comprende, adicionalmente al menos un polímero catiónico.

En otra realización particular, el sistema de nanocápsulas de la presente invención comprende, adicionalmente, al menos un compuesto capaz de facilitar el seguimiento de dichas nanocápsulas tras su aplicación a un ser vivo. En 10 una realización particular, dicho compuesto se selecciona de entre el grupo consistente en un marcador, un agente de seguimiento y un agente de tinción. Son ejemplos de estos compuestos la rodamina B, rodamina 6G, DiD o DiR, que pueden incorporarse al sistema disuelto en el núcleo oleoso, o la trimetilrodamina ó el Alexa Fluor® succiminidil ésteres que pueden unirse covalentemente al polisacárido catiónico y por tanto a la superficie de la nanocápsula.

15 Todos los compuestos que pueden ser asociados al sistema de nanocápsulas de la invención mencionados anteriormente, se pueden adicionar a la fase orgánica o a la fase acuosa previamente a la formación de las mismas, o bien pueden ser adicionados a las nanocápsulas una vez formadas.

Las composiciones farmacéuticas según la invención, incluyen cualquier composición líquida (es decir, suspensión o dispersión de las nanocápsulas de la invención) para aplicación por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, 20 pulmonar, ótica, vaginal, intrauterina, rectal, entérica o parenteral, o cualquier composición en forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su administración por vía tópica, ocular, nasal, vaginal o rectal.

En una realización particular, la composición se administra por vía parenteral ó vía mucosa, preferentemente nasal. 25

El procedimiento para preparar los nanosistemas de la invención tiene la ventaja de emplear técnicas sencillas, fácilmente escalables y que permiten la manufacturación en condiciones estériles.

Así en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido previamente, que comprende: 30

- a) preparar una solución acuosa de poli-D-glucosamina;
- b) preparar una solución orgánica formada por al menos un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo 35 constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos y al menos un agente tensioactivo;
- c) emulsificar las soluciones formadas en a) y b) con la formación espontánea de las nanocápsulas;
- d) incubar el antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas preformadas. 40

Alternativamente, una variante del procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido anteriormente comprende: 45

- a) preparar una solución acuosa de poli-D-glucosamina;
- b) preparar una solución orgánica formada por al menos un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo 50 constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos y al menos un agente tensioactivo;
- c) emulsificar la solución b) en una fase acuosa;
- d) incubar la nanoemulsión obtenida en c) con la solución a);
- e) incubar al menos un antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas preformadas. 55

Para realizar la emulsificación es posible emplear técnicas habituales para este fin, ya conocidas por un experto en la materia, y que permitan obtener glóbulos nanométricos de la fase oleosa, como por ejemplo difusión del disolvente, homogenización o sonicación.

En una realización particular la poli-D-glucosamina se ha marcado previamente con un compuesto capaz de facilitar el seguimiento de las nanocápsulas tras su aplicación a un ser vivo. 60

La incorporación de la poli-D-glucosamina se lleva a cabo mediante la disolución acuosa de la misma a una concentración entre 0,1 y 2 mg/mL, más preferiblemente entre 0,1 y 1 mg/mL, y aún más preferiblemente entre 0,1 y 0,5 mg/mL. 65

De acuerdo con otra realización particular, el agente tensioactivo se disuelve en un solvente orgánico a una concentración de entre 2 y 8 mg/mL, preferiblemente entre 4 y 6 mg/mL.

## ES 2 366 255 A1

En una realización particular, el agente tensioactivo puede estar formado por una mezcla tensioactivos, que pueden ser de tipo aniónico o de tipo no iónico. El uso opcional de una mezcla de tensioactivos se puede realizar con fines estabilizadores del sistema o para mejorar la solubilidad de moléculas hidrofóbicas que se pudiesen incluir en el núcleo oleoso de las nanocápsulas.

5

En otra realización particular, en la misma fase orgánica donde se encuentra el agente tensioactivo se disuelve el aceite adyuvante a una concentración entre 2 y 25 mg/mL, preferiblemente entre 10 y 25 mg/mL.

La formación de las nanocápsulas objeto de la presente invención es consecuencia de un proceso controlado de emulsificación del aceite y el agente tensioactivo, que se produce por difusión del disolvente orgánico de la fase orgánica a la fase acuosa, por homogenización o por sonicación. Este proceso da lugar a la formación de gotículas de aceite de tamaño nanométrico, estabilizadas por el agente tensioactivo, conformando la nanoemulsión primaria. Al mismo tiempo, se produce una interacción electrostática entre el núcleo oleoso de la nanoemulsión dotado de una carga superficial negativa, con la poli-D-glucosamina disuelta en la fase acuosa, y que pasa a recubrir la superficie de las gotículas que la forman. Fruto de dicho proceso controlado, se obtienen las nanocápsulas de tamaño y carga superficial predeterminados, homogéneos, ajustables y reproducibles, con independencia de que se asocie o no antígeno alguno.

15

El antígeno se asocia a las nanocápsulas mediante interacción electrostática con la poli-D-glucosamina que forma la cubierta de las nanocápsulas. Se adiciona en una etapa posterior a la formación de las nanocápsulas mediante incubación conjunta de una solución del antígeno con la suspensión acuosa de nanocápsulas. En una realización particular, la relación en masa entre la poli-D-glucosamina y el antígeno es entre 1:0.01 y 1:0.35, preferiblemente entre 1:0.025 y 1:0.25.

20

Siguiendo el mismo procedimiento de asociación del antígeno se puede incluir al sistema una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras de carácter hidrofílico a la superficie de las nanocápsulas. Así, en una realización particular, el procedimiento descrito previamente comprende adicionalmente la incorporación de una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras de carácter hidrofílico a la superficie de las nanocápsulas una vez formadas mediante interacción electrostática con la poli-D-glucosamina.

25

En el caso de la incorporación de moléculas hidrofóbicas al núcleo oleoso de las nanocápsulas, como pueden ser la molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras, o el compuesto capaz de facilitar el seguimiento de las nanocápsulas tras su aplicación a un ser vivo, éstos se disuelven en la solución orgánica previamente a la formación de las nanocápsulas. Así, en una realización particular, el procedimiento descrito previamente comprende adicionalmente la adición de una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras y/o un compuesto capaz de facilitar el seguimiento de las nanocápsulas tras su aplicación a un ser vivo, ambos de carácter hidrofóbico, en la solución orgánica b).

30

35

La proporción de estas moléculas en el sistema dependerá de la solubilidad de cada molécula en la solución orgánica, así como de la dosis a administrar en el caso de las moléculas bioactivas con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras, ó de la intensidad de fluorescencia que se pretenda conseguir en el caso de los marcadores fluorescentes. En una realización particular la proporción en peso de la molécula bioactiva o del compuesto capaz de facilitar el seguimiento de las nanocápsulas con respecto a la poli-D-glucosamina se encuentra entre el 0,5 y el 50%.

40

El procedimiento de elaboración de las nanocápsulas mencionadas puede incluir una etapa adicional de liofilización, con el fin de preservarlas durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales y se reduzcan los volúmenes de producto que van a manipularse. En una realización particular, el procedimiento descrito previamente comprende adicionalmente una etapa después de la etapa c) ó d), ó alternativamente después de la etapa d) ó e), en la que las nanocápsulas se someten a un proceso de liofilización.

45

Para la liofilización de las nanocápsulas puede ser únicamente necesaria la adición de pequeñas cantidades de azúcares tales como glucosa, sacarosa o trealosa a una concentración que oscila desde un 1 hasta un 20% u otras moléculas que actúen como crioprotectores y/o lioprotectores. Las nanocápsulas de la invención tienen la ventaja adicional de que el tamaño de partícula antes y después de la liofilización no se modifica de manera significativa una vez regeneradas. El proceso puede adicionalmente comprender una etapa de regeneración de las nanocápsulas liofilizadas. El proceso de regeneración del producto liofilizado consiste en la adición de una solución acuosa para dar lugar de nuevo a la suspensión original de nanocápsulas. Por tanto, las nanocápsulas tienen la ventaja de que pueden liofilizarse y resuspenderse sin ninguna alteración en las características de las mismas.

50

55

Debido al elevado potencial de los sistemas coloidales de la presente invención en el campo biomédico, dichos sistemas resultan adecuados para su uso en la formulación de vacunas capaces de modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción de inducción y potenciación inmunológica directa que dé lugar a la generación de protección inmune específica frente a microorganismos patógenos causantes de enfermedades, así como la modulación de la misma, para finalmente generar una respuesta adecuada frente a cada patógeno y así prevenir enfermedades infecciosas en seres humanos y animales.

60

65

En una realización particular, los sistemas de la invención resultan ser adecuados para generar una respuesta inmune específica *in vivo* frente al antígeno asociado, así como la capacidad para estimular de forma directa células humanas/animales del sistema inmunitario *in vitro* o *ex vivo*. En consecuencia, el sistema de nanocápsulas de la inven-

## ES 2 366 255 A1

ción resulta útil en la preparación de un medicamento destinado a la prevención de enfermedades infecciosas mediante la vacunación.

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

### Ejemplos

10 Como procedimiento común a los ejemplos detallados a continuación, se han caracterizado las nanocápsulas desde el punto de vista del tamaño, el potencial  $\zeta$  (o carga superficial), la morfología y la eficacia de asociación.

15 Durante la exposición de algunos de los siguientes ejemplos se hace referencia a resultados obtenidos mediante las siguientes técnicas:

El tamaño de partícula ha sido determinado mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y haciendo uso, para ello, de un ZetaSizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) obteniendo el tamaño medio de la población y el índice de polidispersión de la misma. Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en agua Milli-Q.

20 El potencial  $\zeta$  de las nanocápsulas ha sido determinado mediante la técnica de anemometría por dispersión de láser (LDA) haciendo uso para ello, de un ZetaSizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en una solución 10 milimolar de KCl.

25 Para los estudios *in vivo* de la eficacia de los sistemas de nanocápsulas para inducir una respuesta inmune específica frente a rHBsAg se han utilizado ratones BALB/c. Grupos de 10 ratones se han inmunizado por vía intramuscular e intranasal con 10  $\mu\text{g}$  de rHBsAg asociado a las nanoestructuras, siguiendo diferentes pautas de inmunización. A continuación, se ha realizado una monitorización de los niveles de IgG totales específicos frente a rHBsAg con intervalos de muestreo de 1 mes y una duración total de 6 meses. En todos los estudios se utiliza como control positivo el rHBsAg adsorbido a hidróxido de aluminio (álum, Sigma-Aldrich, España), que es el adyuvante presente en la vacuna comercial, el cual se administra intramuscularmente en dos dosis de 10  $\mu\text{g}$  separadas 4 semanas. Los animales se han mantenido en condiciones de temperatura constante (22°C) con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y dieta estándar.

30 La cuantificación de anti-rHBsAg IgG sérico se realiza mediante ELISA. En este caso se utilizan placas Maxisorb (Nunc, Dinamarca) que se recubren con el rHBsAg. Una vez añadidas las diluciones seriadas del suero, se añade el anticuerpo secundario frente a IgG de ratón y conjugado con peroxidasa (Southern Biotech, USA). El revelado se realiza con ABTS (Sigma-Aldrich, España) y los títulos de anticuerpos se transforman a mIU/mL gracias a una recta de calibrado que se hace de forma paralela con anticuerpos de conejo frente a HBsAg (Biokit, España) a concentraciones conocidas y posteriormente reconocidos por anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Southern Biotech, USA).

35 Los siguientes materiales tal y como se utilizan en los siguientes ejemplos, fueron adquiridos a diferentes casas comerciales: Poly-D-glucosamina de diversos pesos moleculares y grados de acetilación (Biosyntech, Canadá y Pronova, Dinamarca), escualeno (Merck, Alemania), lecitina Epikuron 145V (Cargill, España), imiquimod (InVivoGen, USA), rodamina-6G (Sigma-Aldrich, España), tetrametilrodamina y Alexa Fluor 750 succinimidil ésteres (InvitroGen, USA), rHBsAg (Shantha Biotech, India).

### Ejemplo 1

#### *Preparación de nanocápsulas polisacarídicas con núcleo de escualeno y diferentes cubiertas poliméricas*

50 Se prepararon nanocápsulas con un núcleo de escualeno según el procedimiento de desplazamiento del disolvente. De este modo se han formado las nanocápsulas utilizando dos tipos de poli-D-glucosamina (polisacárido catiónico) de diferente peso molecular (Pm) y grado de acetilación (GA), descritos la tabla 1.

55 TABLA 1

*Características de los polisacáridos catiónicos (poli-D-glucosamina) utilizados para la obtención de nanocápsulas con núcleo de escualeno*

Polisacárido (abreviatura)	Pm (kDa)	GA (%)	Forma	Fabricante
Poli-D-glucosamina (GL)	276	4	Base	Biosyntech Canada
Quitosano (CS)	125	14	Sal clorhidrato	Pronova

## ES 2 366 255 A1

Para ello se preparó una solución acuosa donde el polisacárido se encuentra disuelto a una concentración de 0.025 ó 0.05%, para GL ó CS respectivamente. En el caso del primero, se utiliza una solución acuosa al 0.05% de ácido acético para su disolución. El segundo, al encontrarse en forma de sal clorhidrato, se disuelve en agua Milli-Q.

5 Por otro lado, se prepara una fase orgánica donde, la lecitina se disuelve en propanol a una concentración de 120 mg/mL ó 80 mg/mL en función de la cubierta polimérica (para GL ó CS respectivamente). En esta solución orgánica se co-disuelve el escualeno a una proporción del 25% con respecto al volumen de propanol. Finalmente la fase orgánica se completa con acetona de forma que el volumen de la mezcla propanol:escualeno representa el 6.25% en el total de la misma. La fase orgánica se añade sobre la fase acuosa bajo agitación magnética formándose espontáneamente las nanocápsulas. Se mantiene la agitación durante 5-10 minutos y seguidamente se procede a la evaporación de los solventes orgánicos a vacío hasta conseguir una concentración final del polisacárido que forma parte de las nanocápsulas de 1 mg/mL.

15 Las relaciones entre el polisacárido y el tensioactivo aniónico (lecitina) se muestran en la tabla 2. Asimismo, dicha tabla muestra el diámetro medio, índice de polidispersión (PdI) y carga eléctrica superficial (potencial  $\xi$ ) de los sistemas obtenidos. La morfología de las nanocápsulas vista en microscopio electrónico se muestra en la figura 1 donde se puede apreciar que presentan una forma esférica y poblaciones homonogéneas.

TABLA 2

20 *Características físico-químicas de nanocápsulas (NC) elaboradas a partir de dos tipos de poli-D-glucosamina (GL ó CS)*

	Polisacárido:lecitina (p:p)	Tamaño (nm)	PdI	Potencial $\xi$ (mV)	
25	<b>GLNC</b>	1:12	172 ± 3	0.16 ± 0.03	+66 ± 1
30	<b>CSNC</b>	1:4	199±2	0.15 ± 0.02	+40 ± 2

35 Ejemplo 2

### *Encapsulación de imiquimod en el núcleo de escualeno de las nanocápsulas*

40 Se prepararon nanocápsulas en cuyo núcleo de escualeno se ha encapsulado una molécula bioactiva con propiedades farmacológicas probadas inmunoestimulantes e inmunomoduladoras (imiquimod). El imiquimod se adiciona a la preparación de nanocápsulas a diversas proporciones con respecto al peso total de los componentes del sistema (indicado en tabla 3). Así, se prepararon nanocápsulas a partir de ambos polisacáridos con diferente grado de desacetilación y peso molecular (tabla 1).

45 Para ello se preparó una solución acuosa donde el polisacárido se encuentra disuelto a una concentración de 0.025 ó 0.05%, para GL ó CS respectivamente. En el caso del primero, se utiliza una solución acuosa al 0.05% de ácido acético para su disolución. El segundo, al encontrarse en forma de sal clorhidrato, se disuelve en agua Milli-Q.

50 Para lograr la encapsulación del imiquimod, de carácter altamente hidrofóbico, se disuelve previamente en el aceite (escualeno) a una concentración de 20 mg/mL. Por otro lado, la lecitina se disuelve en propanol a una concentración de 120 mg/mL ó 80 mg/mL en función de la cubierta de cada formulación (para GL ó CS respectivamente). En esta solución orgánica se co-disuelve la solución oleosa de escualeno e imiquimod a una proporción del 25% con respecto al volumen de propanol. Finalmente la fase orgánica se completa con acetona de forma que el volumen de la mezcla propanol:escualeno representa el 6.25% en el total de la misma. La fase orgánica se añade sobre la fase acuosa bajo agitación magnética formándose espontáneamente las nanocápsulas polisacarídicas. Se mantiene la agitación durante 5-10 minutos y seguidamente se procede a la evaporación de los solventes orgánicos a vacío hasta conseguir una concentración final del polisacárido que forma parte de las nanocápsulas de 1 mg/mL.

60 La eficacia de encapsulación del imiquimod se ha determinado de forma indirecta mediante la cuantificación de la molécula libre mediante HPLC (Agilent, USA) tras el aislamiento de las nanocápsulas por ultracentrifugación (42800xg, 1 hora, 15°C; Beckman-Coulter, UK).

65 En la tabla 3 se muestran además el diámetro medio, índice de polidispersión (PdI) y carga eléctrica superficial (potencial  $\xi$ ) de los sistemas obtenidos con diferentes cubiertas polisacarídicas, así como el porcentaje de imiquimod encapsulado en cada sistema.

## ES 2 366 255 A1

TABLA 3

*Características físico-químicas de nanocápsulas elaboradas a partir de dos tipos de poli-D-glucosamina encapsulando imiquimod*

	Carga teórica (%)	Tamaño (nm)	PdI	Potencial $\xi$ (mV)	E.E.* (%)
<b>IMQ GLNC</b>	1.43	198 $\pm$ 5	0.07 $\pm$ 0.01	+63 $\pm$ 1	40
<b>IMQ CSNC</b>	1.85	196 $\pm$ 8	0.15 $\pm$ 0.02	+42 $\pm$ 4	70

\*E.E.: eficacia de encapsulación

### 20 Ejemplo 3

#### *Encapsulación de Rodamina-6G en el núcleo de escualeno de las nanocápsulas*

Se prepararon nanocápsulas fluorescentes con cubierta de poli-D-glucosamina (GL - tabla 1) y núcleo oleoso de escualeno. Para este fin se ha encapsulado un marcador fluorescente de carácter hidrofóbico, la rodamina-6G, en el núcleo oleoso de las mismas.

Para ello se preparó una solución acuosa donde el polisacárido se encuentra disuelto a una concentración de 0.025% en una solución acuosa al 0.05% de ácido acético para su disolución.

Para lograr la encapsulación de la rodamina-6G, de carácter altamente hidrofóbico, se disuelve previamente en el aceite (escualeno) a una concentración de 0.25 mg/mL. Por otro lado, la lecitina se disuelve en propanol a una concentración de 120 mg/mL. En esta solución orgánica se co-disuelve la solución oleosa de escualeno y rodamina-6G a una proporción del 25% con respecto al volumen de propanol. Finalmente la fase orgánica se completa con acetona de forma que el volumen de la mezcla propanol:escualeno representa el 6.25% en el total de la misma. La fase orgánica se añade sobre la fase acuosa bajo agitación magnética formándose espontáneamente las nanocápsulas. Se mantiene la agitación durante 5-10 minutos y seguidamente se procede a la evaporación de los solventes orgánicos a vacío hasta conseguir una concentración final del polisacárido que forma parte de las nanocápsulas de 1 mg/mL.

La eficacia de encapsulación de la rodamina se ha determinado de forma indirecta mediante la cuantificación de la etiqueta fluorescente libre mediante fluoroespectroscopía ( $\lambda_{exc}=480$ ;  $\lambda_{em}=555$ ; Perkin-Elmer, USA) tras el aislamiento de las nanocápsulas por ultracentrifugación (42800xg, 1 hora, 15°C; Beckman-Coulter, UK).

El diámetro medio de las nanocápsulas obtenidas fue de 190  $\pm$  2 nm (índice de polidispersión de 0.14) y su carga eléctrica superficial (potencial  $\xi$ ) de +60  $\pm$  2 mV con un porcentaje de asociación de la rodamina-6G de 82.5  $\pm$  1.7%.

### Ejemplo 4

#### *Preparación de nanocápsulas con núcleo de escualeno formadas a partir de un polisacárido catiónico marcado con una sonda fluorescente*

Se prepararon nanocápsulas fluorescentes con cubierta de poli-D-glucosamina (GL - tabla 1), previamente marcada con una sonda fluorescente, y núcleo oleoso de escualeno. Para ello se han utilizado la tetrametilrodamina (TAMRA) ( $\lambda_{exc}=540$ ;  $\lambda_{em}=580$ ) y el Alexa Fluor 750 ( $\lambda_{exc}=749$ ;  $\lambda_{em}=775$ ) succiminidil ésteres.

Para el marcaje del polisacárido con cualquiera de estos dos marcadores fluorescentes, éste se disuelve en una solución acuosa de ácido acético 0.01% a 2 mg/mL. Sobre esta solución se añaden, bajo agitación magnética, 30  $\mu$ l de una solución de TAMRA ó Alexa Fluor 750 succiminidil éster en DMSO (10 mg/mL) y se deja reaccionar durante 15 minutos. La solución resultante se dializa en agua (Slide-A-Lyzer Dyalisis Cassettes, Thermo Scientific, USA) durante 24 horas. El grado de marcaje de la poli-D-glucosamina con TAMRA y Alexa Fluor 750 succiminidil éster se ha realizado mediante espectrometría UV ( $\lambda=280$ ) (Beckman-Coulter, UK), según especificaciones del fabricante.

Finalmente, la poli-D-glucosamina marcada con TAMRA ó Alexa Fluor 750 se utiliza para la elaboración de las nanocápsulas, para lo cual se diluye con agua Milli-Q a una concentración de 0.025%. Por otro lado, se prepara una fase orgánica donde la lecitina se disuelve en propanol a una concentración de 120 mg/mL. En esta solución orgánica se co-disuelve el escualeno a una proporción del 25% con respecto al volumen de propanol. Finalmente

la fase orgánica se completa con acetona de forma que el volumen de la mezcla propanol:escualeno representa el 6.25% en el total de la misma. La fase orgánica se añade sobre la fase acuosa bajo agitación magnética formándose espontáneamente las nanocápsulas. Se mantiene la agitación durante 5-10 minutos y seguidamente se procede a la evaporación de los solventes orgánicos a vacío hasta conseguir una concentración final del polisacárido que forma parte de las nanocápsulas de 1 mg/mL.

En la tabla 4 se muestran además el diámetro medio, índice de polidispersión (PdI) y carga eléctrica superficial (potencial  $\xi$ ) de los sistemas obtenidos con ambos marcadores fluorescentes.

TABLA 4

*Características físico-químicas de nanocápsulas fluorescentes elaboradas a partir de poli-D-glucosamina previamente marcada con tetrametilrodamina (TAMRA) ó Alexa Fluor 750 succinimidil ésteres*

	Tamaño (nm)	PdI	Potencial $\xi$ (mV)
<b>TAMRA-GLNC</b>	215 $\pm$ 2	0.21 $\pm$ 0.01	+ 56 $\pm$ 1
<b>Alexa Fluor 750-GLNC</b>	222 $\pm$ 1	0.17 $\pm$ 0.01	+ 57 $\pm$ 1

## Ejemplo 5

*Las nanocápsulas forman un depot en el lugar de inyección*

Se ha estudiado el tiempo de residencia en el lugar de inyección de las nanocápsulas de poli-D-glucosamina marcada con Alexa Fluor 750. Para ello, se ha utilizado la técnica de adquisición de imágenes de fluorescencia *in vivo*, (IVIS Xenogen, USA) realizando un seguimiento a tiempo real de las nanocápsulas fluorescentes una vez administradas a ratones BALB/c por vía intramuscular.

Como podemos apreciar en la figura 2, las nanocápsulas permanecen en el lugar de inyección durante al menos 5 horas tras la inyección de una dosis de 60  $\mu$ g de poli-D-glucosamina marcada formando parte de la cubierta de las nanocápsulas.

## Ejemplo 6

*Asociación del antígeno recombinante de superficie de la hepatitis B (rHBsAg) a la superficie polimérica de las nanocápsulas*

Se han preparado nanocápsulas capaces de asociar en su superficie el antígeno recombinante de superficie de la hepatitis B (rHBsAg). Para este fin, se han preparado las nanocápsulas polisacáridicas según los procedimientos descritos anteriormente (ejemplos 1 y 2) con diferentes composiciones en su núcleo oleoso (escualeno ó escualeno con imiquimod) ó cubierta polisacáridica (CS ó GL - tabla 1). El rHBsAg se añade posteriormente a la formación de las nanocápsulas mediante incubación a temperatura ambiente de la solución de antígeno (0.5 mg/mL) con la suspensión de la nanocápsulas previamente aisladas y resuspendidas en agua hasta una concentración del polisacárido constituyente de 1 mg/mL. De esta forma se consigue asociar el antígeno a una relación 1:0.25 de polisacárido:rHBsAg (p:p).

La eficacia de asociación del rHBsAg se determinó mediante cuantificación por ELISA tipo sandwich. Para ello, se utilizó un kit para la detección de dicho antígeno (HBsAg Version 3, Murex, UK). Para la correspondiente cuantificación, se prepara una recta de calibrado con concentraciones conocidas del antígeno utilizando como blanco las nanocápsulas blancas o el sobrenadante obtenido tras la centrifugación de las mismas en función del tipo de muestra que se analice. Se ha analizado tanto de forma indirecta cuantificando el antígeno libre tras el aislamiento de las nanocápsulas por ultracentrifugación (42800xg, 1 hora, 15°C; Beckman Coulter, UK), así como el total liberado tras el tratamiento enzimático de las nanocápsulas con quitosanas (US Biologicals, USA).

En la tabla 5 se muestran además el diámetro medio, índice de polidispersión (PdI) y carga eléctrica superficial (potencial  $\xi$ ) de los sistemas obtenidos con las diferentes combinaciones de composición del núcleo y la cubierta después de la incubación de los sistemas con el rHBsAg. La morfología de las nanocápsulas con rHBsAg vista en microscopio electrónico se muestra en la figura 3 donde se pueden apreciar que presentan una forma esférica y poblaciones homogeneas.

TABLA 5

Características físico-químicas de nanocápsulas que presentan diferente composición en su núcleo (solo escualeno; escualeno e imiquimod (IMQ)), con rHBsAg asociado a las diferentes cubiertas polisacáridicas (CS ó GL) con una relación polisacárido:rHBsAg 1:0.25 (p:p)

Composición	Tamaño (nm)	PdI	Potencial $\xi$ (mV)	E.A.* (%)
CSNC:rHBsAg	211 $\pm$ 7	0,12 $\pm$ 0,03	+42 $\pm$ 11	77 $\pm$ 3
IMQ CSNC:rHBsAg	191 $\pm$ 4	0,10 $\pm$ 0,02	+43 $\pm$ 5	75 $\pm$ 5
GLNC:rHBsAg	230 $\pm$ 13	0,23 $\pm$ 0,02	+60 $\pm$ 3	72 $\pm$ 8
IMQ GLNC:rHBsAg	299 $\pm$ 11	0,26 $\pm$ 0,04	+60 $\pm$ 4	78 $\pm$ 6

\*E.A.: eficacia de asociación

#### Ejemplo 7

Elaboración de un producto liofilizado a partir de las nanocápsulas polisacáridicas blancas y con el antígeno recombinante de superficie de la hepatitis B (rHBsAg) asociado

Con el objetivo de desarrollar una forma farmacéutica más estable, las nanocápsulas fueron liofilizadas. Para ello, se prepararon las nanocápsulas polisacáridicas con poli-D-glucosamina (GL - tabla 1) como cubierta y núcleo de escualeno, como se ha descrito previamente, así como la posterior asociación de rHBsAg a la superficie de las nanocápsulas preformadas.

Las suspensiones de nanopartículas polisacáridicas con o sin antígeno asociado fueron liofilizadas en presencia de diferentes concentraciones de trehalosa en función de la presencia de rHBsAg en la superficie de las nanoestructuras. De este modo, la liofilización se produce con una concentración final de trehalosa del 5 ó 20%, para nanocápsulas blancas ó para las que llevan asociado rHBsAg, respectivamente. Para ello, las suspensiones (1 mL) de nanocápsulas fueron sometidas a un proceso de congelación a -20°C y subsiguiente liofilización (Virtis Genesis freeze dryer, 25ES, Virtis, NY, USA). Tras la liofilización, los sistemas de nanocápsulas fueron regenerados sin dificultad mediante adición de 1 mL de agua Milli-Q, recuperando la suspensión acuosa de nanocápsulas y, a continuación, se determinó el tamaño medio de las nanopartículas. En la Figura 4 se muestra la conservación del tamaño de partícula tras la resuspensión en agua Milli-Q del polvo liofilizado elaborado a partir de las nanocápsulas con y sin antígeno asociado.

#### Ejemplo 8

Asociación de dos proteínas antigénicas derivadas de la cápside del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16-L1 y HPV16-GSTL1) a la superficie polimérica de las nanocápsulas

Se han preparado nanocápsulas capaces de asociar en su superficie dos proteínas antigénicas derivadas de la cápside (capsómeros) del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16). Dichas capsómeros se denominan HPV16-L1 y HPV16-GSTL1. Para este fin, se han preparado las nanocápsulas según los procedimientos descritos anteriormente (ejemplos 1) con núcleo oleoso de escualeno y cubierta polisacáridica (GL - tabla 1). Los capsómeros derivadas de HPV16 se añaden posteriormente a la formación de las nanocápsulas mediante incubación a temperatura ambiente de la solución de proteína (0.1 mg/mL) con la suspensión de la nanocápsulas previamente aisladas y resuspendidas en agua a diferentes concentraciones del polisacárido constituyente (0.2; 0.4 y 0.8 mg/mL). De esta forma se consigue asociar cada proteína antigénica a distintas relaciones polisacárido:proteína (p:p): 2:1; 4:1 y 8:1 respectivamente.

La eficacia de asociación de los capsómeros de HPV16 se determinó mediante cuantificación por DOT-BLOT, de forma indirecta cuantificando el antígeno libre tras el aislamiento de las nanocápsulas por centrifugación (20000xg, 1 hora, 15°C; Hettich Zentrifugen, Alemania). Para ello, la muestra de sobrenadante o las soluciones estándar de proteína, se inoculan directamente sobre una membrana de PVDF. Para la detección de la proteína adherida se utilizó un anticuerpo primario de conejo anti-L1 a una dilución 1:20000 y posteriormente se usó un anticuerpo secundario de mono anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (abcam, UK) a una dilución 1:5000. Para la correspondiente cuantificación, se prepara una recta de calibrado con concentraciones conocidas del antígeno. Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizan por quimioluminiscencia utilizando el kit de detección ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, UK). El posterior análisis de la intensidad de los puntos correspondientes a las distintas concentraciones de antígenos se realiza mediante ImageJ.

## ES 2 366 255 A1

En la tabla 6 se muestran además el diámetro medio, índice de polidispersión (PdI) y carga eléctrica superficial (potencial  $\xi$ ) de los sistemas obtenidos después de la incubación de los sistemas con las dos proteínas antigénicas de HPV16 a las distintas proporciones polisacárido:antígeno.

TABLA 6

*Características físico-químicas de las nanocápsulas con núcleo de escualeno y cubierta polisacáridica (GL) con los capsómeros HPV16-L1 y HPV16-GSTL1 asociados a distintas proporciones polisacárido:rHBsAg (p:p)*

Capsómero HPV16	GL:capsómero	Tamaño (nm)	PdI	Potencial $\xi$ (mV)	E.A.* (%)
L1	2:1	240,5 ± 48,2	0,15 ± 0,04	+28,2 ± 3,5	93,6 ± 5,8
	4:1	212,8 ± 5,5	0,14 ± 0,03	+32,4 ± 7,6	86,7 ± 13,0
	8:1	210,0 ± 5,7	0,12 ± 0,01	+39,9 ± 1,8	97,2 ± 10,3
GST-L1	2:1	212,6 ± 0,1	0,15 ± 0,03	+28,7 ± 8,5	64,6 ± 21
	4:1	209,3 ± 2,8	0,13 ± 0,02	+35,1 ± 4,7	43,7 ± 10,0
	8:1	209,7 ± 4,1	0,11 ± 0,01	+38,9 ± 1,6	25,3 ± 19,9

\*E.A.: eficacia de asociación

### Ejemplo 9

*Las nanocápsulas con núcleo de escualeno a las cuales se ha asociado rHBsAg en su superficie, son capaces de generar respuestas inmunológicas protectoras a largo plazo frente a hepatitis B cuando se administran por vía nasal*

Las nanocápsulas a base de poli-D-glucosamina (GL - tabla 1) y núcleo de escualeno, a cuya superficie se ha asociado rHBsAg y previamente descritas en los ejemplos 1 y 6, han sido sometidas a evaluación biológica. Para ello se administraron a ratones BALB/c por vía nasal, 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado a las nanocápsulas, en 2 ó 3 dosis separadas 4 semanas entre cada una. Para determinar la respuesta inmune generada tras la inmunización nasal se ha cuantificado la concentración de anticuerpos específicos (IgG) en sangre a los diferentes tiempos de muestreo tal y como se ha descrito previamente. La duración de la monitorización de los niveles plasmáticos de IgG se ha realizado durante 6 meses.

Como se puede apreciar en figura 5 tras la inmunización nasal con las nanocápsulas polisacáridicas se consiguen niveles seroprotectores de IgG frente a hepatitis B (>10 mIU/mL, descritos para humanos: Shouval D. Hepatitis B vaccines. J Hepatol 2003;39: S70-76) prolongados en el tiempo. Sin embargo la concentración de anticuerpos específicos es mayor (>100 mIU/mL) cuando el esquema de inmunización es de 3 dosis de 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado a las nanocápsulas.

### Ejemplo 10

*La modificación de la composición del núcleo oleoso de las nanocápsulas permite la modulación en la cinética de la respuesta inmune específica generada tras la administración intramuscular de los sistemas a los cuales se ha asociado rHBsAg en su superficie*

Se ha evaluado la capacidad adyuvante de las nanocápsulas a base de poli-D-glucosamina (GL - tabla 1) con núcleos oleosos de diferentes composiciones (escualeno ó escualeno+imiquimod), a cuya superficie se ha asociado rHBsAg, previamente descritas en el ejemplo 6.

Para ello se administraron 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado a las nanocápsulas a ratones BALB/c en 2 dosis separadas 4 semanas. Como control positivo se utilizó la vacuna comercial (rHBsAg-álum), administrada siguiendo el mismo esquema de inmunización que para las nanocápsulas. Para determinar la respuesta inmune generada tras la inmunización se ha cuantificado la concentración de anticuerpos específicos (IgG) en sangre a los diferentes tiempos de muestreo tal y como se ha descrito previamente. La duración de la monitorización de los niveles plasmáticos de IgG se ha realizado durante 6 meses.

Como se puede apreciar en figura 6 tras la segunda inmunización por vía intramuscular las nanocápsulas presentan un evidente efecto adyuvante, generando niveles plasmáticos de IgG mayores que los conseguidos con el adyuvante comercial (álum) a la misma dosis, independientemente de la composición de las nanocápsulas. Por otro lado, se observa que las nanocápsulas con núcleo de escualeno dan lugar a una respuesta inmune intensa a tiempos más largos (GLNC). La inclusión del imiquimod (IMQ-GLNC) en el núcleo oleoso da lugar a la inducción de una respuesta específica más temprana que mantiene niveles elevados de anticuerpos en el tiempo.



## ES 2 366 255 A1

### Ejemplo 11

*Las nanocápsulas son capaces de generar niveles seroprotectores frente a la hepatitis B que se prolongan durante largos períodos de tiempo cuando se administran en una dosis única por vía intramuscular*

5

Se ha evaluado la capacidad para generar respuestas inmunes prolongadas tras una única administración intramuscular de las nanocápsulas a base de poli-D-glucosamina (GL - tabla 1) con núcleos oleosos de diferentes composiciones (escualeno ó escualeno+imiquimod), a cuya superficie se ha asociado rHBsAg, previamente descritas en el ejemplo 6.

10

Para ello se administraron a ratones BALB/c, 10  $\mu$ g de rHBsAg asociado a las nanocápsulas en una dosis única. Como control positivo se utilizó la vacuna comercial (rHBsAg-alum) administrada en dos dosis de 10  $\mu$ g separadas 4 semanas. Para determinar la respuesta inmune generada tras la inmunización se ha cuantificado la concentración de anticuerpos específicos (IgG) en sangre a los diferentes tiempos de muestreo tal y como se ha descrito previamente. La duración de la monitorización de los niveles plasmáticos de IgG se ha realizado durante 6 meses.

15

Como se puede apreciar en figura 7, las nanocápsulas a base de poli-D-glucosamina son capaces de generar niveles seroprotectores ( $>10$  mIU/mL, descritos para humanos: Shouval D. Hepatitis B vaccines. J Hepatol 2003;39: S70-76) de anticuerpos específicos frente a hepatitis B. Además, la respuesta inmune específica generada tras una dosis única con las nanocápsulas a base de poli-D-glucosamina se mantiene en niveles altos de IgG durante un largo período de tiempo (6 meses) independientemente de la composición del núcleo oleoso, no siendo estos niveles significativamente diferentes a aquellos generados por la vacuna comercial administrada en dos dosis.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 366 255 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema para la administración de antígenos que comprende nanocápsulas con un tamaño medio inferior a 1 micrómetro, que comprenden:
- e) poli-D-glucosamina;
  - f) un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos;
  - 10 g) al menos un agente tensioactivo excluyendo tensioactivos catiónicos; y
  - h) al menos un antígeno;
- 15 **caracterizadas** por presentar una estructura tipo reservorio, donde el núcleo está compuesto por componentes lipídicos y está recubierto por poli-D-glucosamina.
- 20 2. Sistema según la reivindicación 1, donde el aceite adyuvante se selecciona de entre el grupo consistente en vitamina A, vitamina E, escualeno y escualano.
3. Sistema según la reivindicación 2, donde el aceite adyuvante es escualeno.
4. Sistema según la reivindicación 1, donde el agente tensioactivo se selecciona entre tensioactivos de tipo aniónico y de tipo no iónico.
- 25 5. Sistema según la reivindicación 4, donde el agente tensioactivo es de tipo aniónico.
6. Sistema según la reivindicación 5, donde el agente tensioactivo aniónico es un fosfolípido.
- 30 7. Sistema según la reivindicación 1 donde el antígeno es de origen viral.
8. Sistema según reivindicación 7, donde el antígeno de origen viral se selecciona de entre el grupo consistente en antígenos subunidad característicos de virus de la hepatitis A, B, C ó E, virus del papiloma humano, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, virus de la influenza, citomegalovirus, virus del herpes simple, SARS coronavirus, rotavirus, virus sincicial respiratorio, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubeola, virus de Epstein-Barr, virus del dengue, virus de la varicela Zoster.
- 35 9. Sistema según reivindicación 8, donde el antígeno es un antígeno subunidad característico del virus de la hepatitis B.
- 40 10. Sistema según las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladoras.
11. Sistema según reivindicación 10, donde la molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladoras es de carácter hidrofóbico.
- 45 12. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las nanocápsulas se encuentran en forma liofilizada.
- 50 13. Vacuna que comprende un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Composición farmacéutica que comprende un sistema como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 55 15. Composición farmacéutica, según la reivindicación 14, para su uso en la prevención de enfermedades infecciosas.
16. Un procedimiento para la preparación de un sistema como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:
- 60 a) preparar una solución acuosa de poli\_D-glucosamina;
- b) preparar una solución orgánica formada por al menos un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos y al menos un agente tensioactivo;
- 65 c) emulsificar las soluciones formadas en a) y b) con la formación espontánea de las nanocápsulas;
- d) incubar al menos un antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas preformadas.

## ES 2 366 255 A1

17. Un procedimiento para la preparación de un sistema como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende:

- 5 a) preparar una solución acuosa de poli-D-glucosamina;
- b) preparar una solución orgánica formada por un aceite adyuvante seleccionado de entre el grupo constituido por isoprenoides, terpenoides y terpenos y al menos un agente tensioactivo;
- 10 c) emulsificar la solución b) en una fase acuosa;
- d) incubar la nanoemulsión obtenida en c) con la solución a);
- e) incubar al menos un antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas preformadas.

15 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, que comprende además la adición de una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras y/o un compuesto capaz de facilitar el seguimiento de las nanocápsulas tras su aplicación a un ser vivo, ambos de carácter hidrofóbico, en la solución orgánica b).

20 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, que comprende además la adición de una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes ó inmunomoduladoras de carácter hidrofílico sobre la superficie de las nanocápsulas una vez formadas.

25 20. Uso de un sistema como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la preparación de una vacuna.

21. Uso, según la reivindicación 20, para la preparación de una vacuna para la prevención de enfermedades infecciosas.

30 22. Uso, según la reivindicación 21, para la prevención de enfermedades infecciosas causadas por agentes víricos.

23. Uso, según reivindicación 22, para la prevención de enfermedades infecciosas víricas seleccionadas de entre el grupo consistente en hepatitis A, B, C y E, cáncer cervical causado por el virus del papiloma humano, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), gripe estacional, gripe pandémica, mononucleosis infecciosas por citomegalovirus ó por virus de Epstein-Barr, infección por herpes simple, gastroenteritis por rotavirus, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, neumonía por virus sincicial respiratorio, encefalitis japonesa, dengue, rubeola, paperas, sarampión y varicela Zoster.

Figura 1



Figura 2

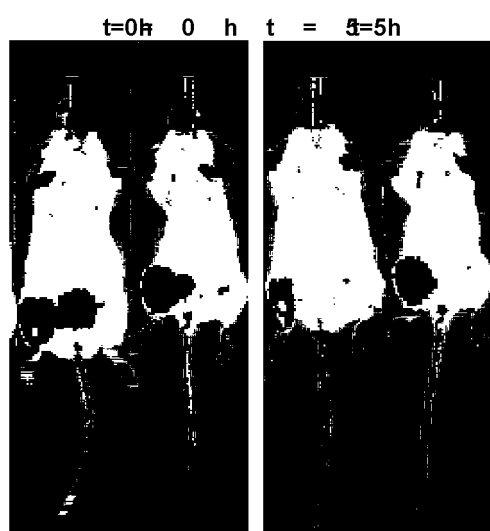


Figura 3



Figura 4 (A)

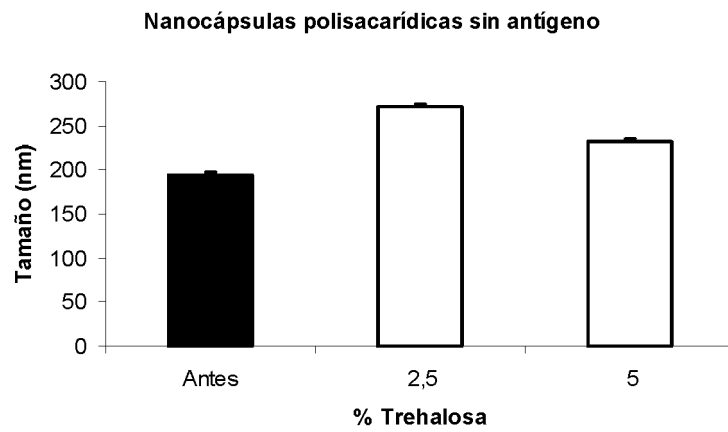


Figura 4 (B)

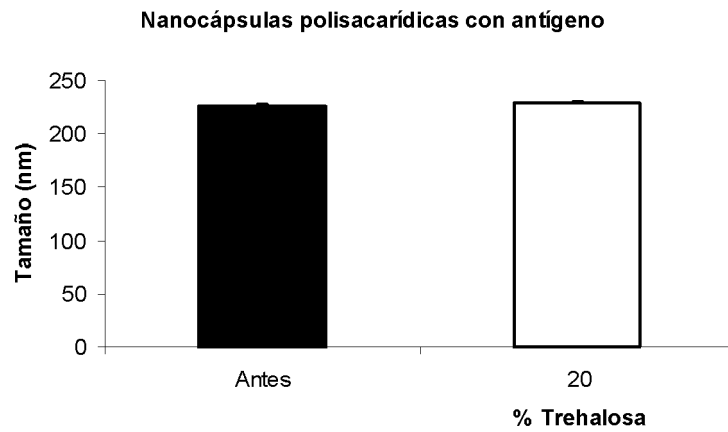


Figura 5

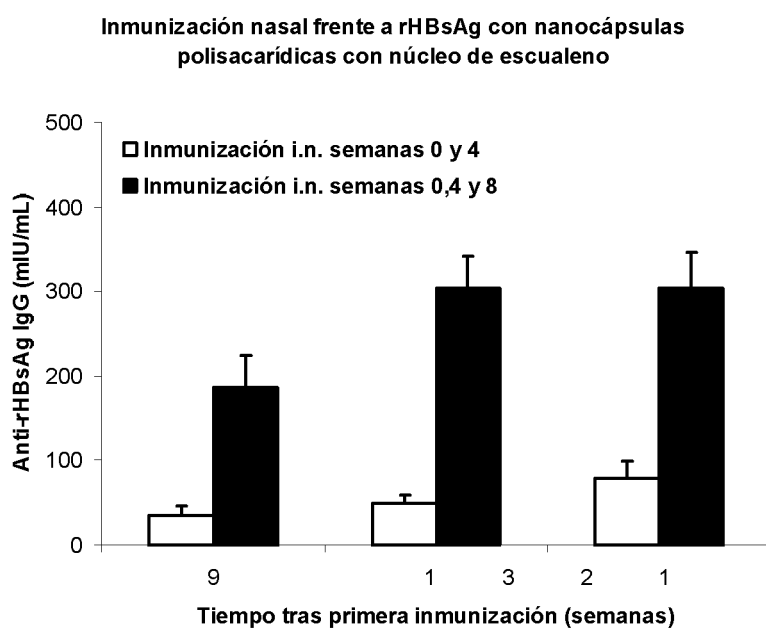


Figura 6

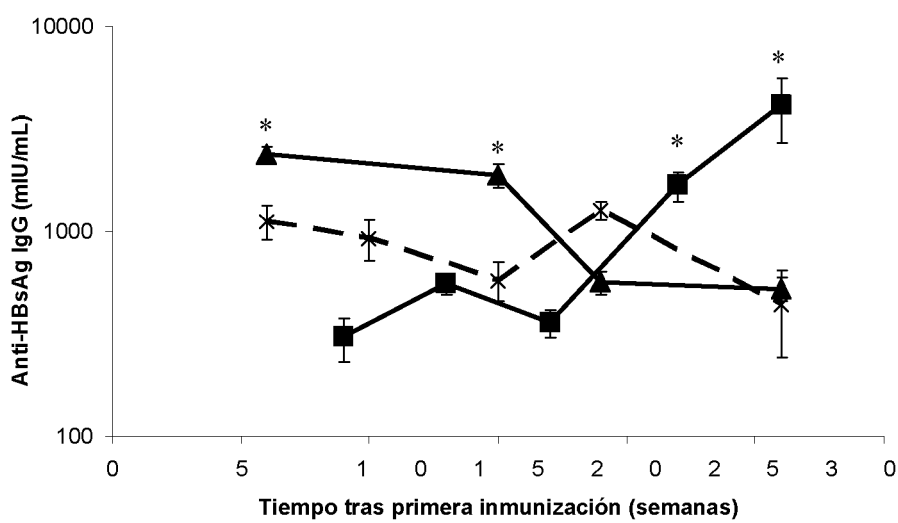
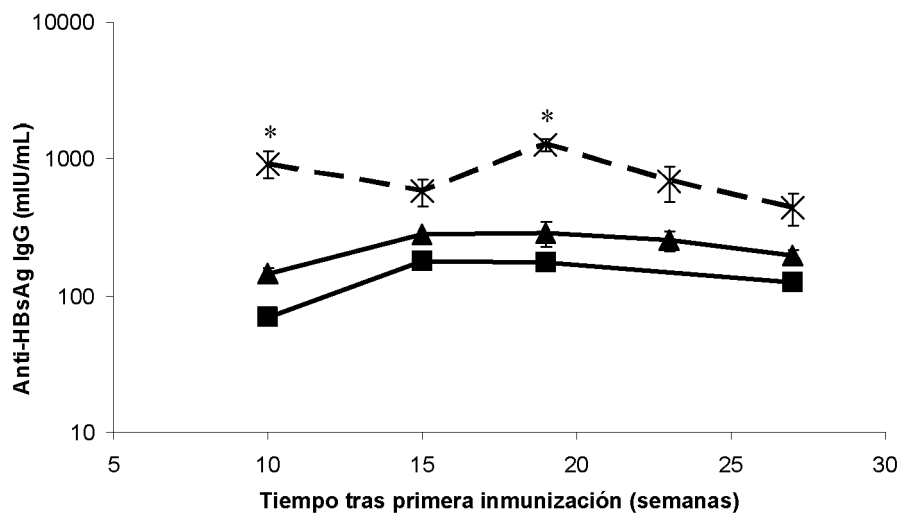


Figura 7





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131074

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.06.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20090074824 A1 (VILA PENA A. I.) 19.03.2009, resumen; párrafos 1,9,15,17-22,24-25,38,40,53,75,104-109; reivindicaciones 1,14,29.	1-8,10-11,13-14,16-18,20-23
Y	US 5965144 A (ZONAGEN, INC.) 12.10.1999, columnas 3,4.	1-8,10-11,13-14,16-18,20-23
A	CSABA N., GARCÍA-FUENTES M., ALONSO M. J. "Nanoparticles for nasal vaccination." Advanced Drug Delivery Reviews (2009) Vol. 61, páginas 140-157. Todo el documento.	1-23
A	PREGO C. et al. "Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection." Vaccine (2010) Vol. 28, páginas 2607-2614. Todo el documento.	1-23
A	ES 2234723 T3 (COGNIS IBERIA, S.L.) 01.07.2005, página 2, líneas 7-10; página 3, líneas 10-16; página 11, líneas 24-34.	1-23

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.09.2011

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/5



## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K9/51** (2006.01)

**A61K47/48** (2006.01)

**A61K39/12** (2006.01)

**C08B37/08** (2006.01)

**B82Y5/00** (2011.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C08B, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP EMBASE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.09.2011

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23.	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 9, 12, 15, 19.	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8, 10-11, 13-14, 16-18, 20-23.	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20090074824 A1 (VILA PENA A. I.)	19.03.2009
D02	US 5965144 A (ZONAGEN, INC.)	12.10.1999
D03	CSABA N., GARCÍA-FUENTES M., ALONSO M. J. "Nanoparticles for nasal vaccination." <i>Advanced Drug Delivery Reviews</i> (2009) Vol. 61, páginas 140-157.	2009
D04	PREGO C. et al. "Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection." <i>Vaccine</i> (2010) Vol. 28, páginas 2607-2614.	2010
D05	ES 2234723 T3 (COGNIS IBERIA, S.L.)	01.07.2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en un sistema para la administración de antígenos que comprende nanocápsulas compuestas por una cubierta de poli-D-glucosamina, un aceite adyuvante isoprenoide, terpenoide o terpeno en el núcleo, un agente tensioactivo no catiónico y al menos un antígeno (reivindicaciones 1-12).

La presente solicitud de invención también consiste en una vacuna que comprende el sistema reivindicado anteriormente (reivindicación 13), una composición farmacéutica que comprende dicho sistema (reivindicación 14-15), un procedimiento para la preparación del sistema (reivindicación 16-19), y el uso del sistema en la preparación de una vacuna para la prevención de enfermedades infecciosas (reivindicaciones 20-23).

El documento D01 consiste en un sistema de nanocápsulas que comprende una fase lipófila compuesta por un fosfolípido y una fase hidrófila que comprende chitosan o un derivado.

El documento D02 consiste en un método y una composición para potenciar la respuesta inmunológica que comprende chitosan.

El documento D03 consiste en un estudio sobre el uso de nanotransportadores para la administración de antígenos por vía nasal (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en un estudio de las nanopartículas que comprenden polisacáridos, como el chitosan, a modo de estructuras para presentar antígenos, como los antígenos del virus de la hepatitis B (ver todo el documento).

El documento D05 consiste en nanocápsulas para su uso en cosmética, industria farmacéutica o industria textil, que comprenden una matriz formada por lecitinas o fosfolípidos, cuerpos de cera y principios activos y una envoltura de quitosanos (ver página 2, líneas 7-10, página 3, líneas 10-16 y página 11, líneas 24-34).

**NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).****Reivindicaciones 1-23.**

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo al objeto de las reivindicaciones 1-23, y muestra un sistema de nanopartículas de tamaño menor a 1µm.

El objeto de las reivindicaciones 1-23 difiere del conocido documento D01 en que el aceite adyuvante que comprende la nanopartícula no es del mismo tipo que el reivindicado en la presente solicitud de invención.

Por lo tanto el objeto de las reivindicaciones 1-23 es nuevo según el artículo 6.1 Ley 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).Reivindicaciones 1-8, 10-11, 13-14, 16-18, 20-23.

El documento D01 divulga un sistema de nanocápsulas de tamaño menor a 1µm, que comprende quitosan (poli-D-glucosamina), un aceite adyuvante, un agente tensoactivo aniónico que es un fosfolípido y un antígeno (ver resumen, párrafos 1, 9, 15, 17-22, 25, 38, 40, 53, 75, 109 y reivindicación 1).

Dicho sistema comprende adicionalmente una molécula bioactiva con propiedades inmunoestimulantes o inmunomoduladoras y de carácter hidrofóbico (ver párrafo 24).

El documento D01 también divulga una composición farmacéutica que comprende el sistema anteriormente divulgado (ver reivindicación 14) y un procedimiento para la preparación de dicho sistema que comprende las fases de preparación de la fase acuosa con quitosan, la fase de preparación de la fase orgánica con el aceite adyuvante, con o sin agente tensoactivo, emulsionar ambas soluciones con la formación espontánea de las nanocápsulas e incubar el antígeno sobre la superficie de las nanocápsulas (ver párrafos 104-108 y reivindicación 29).

El documento D01 no divulga el uso de isoprenoides, terpenoides o terpenos como aceite adyuvante del sistema de nanocápsulas, sino que utiliza ácidos grasos. Sin embargo, el documento D02 divulga el uso de escualeno junto a quitosan y antígenos de HIV en emulsiones para la fabricación de vacunas para prevenir enfermedades infecciosas, como HIV (ver columna 3 y 4).

Por tanto se considera que el aceite adyuvante divulgado en el documento D01 o el divulgado en el documento D02 son posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias para preparar la emulsión con quitosan, sin el ejercicio de actividad inventiva, para la preparación del sistema reivindicado.

Por tanto se considera que las reivindicaciones 1-8, 10-11, 13-14, 16-18, 20-23 no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.

Reivindicaciones 9, 12, 15, 19.

La reivindicaciones 9, 12, 15 y 19 implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.