(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 382 625**

(21) Número de solicitud: 201031678

(51) Int. CI.:

B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 47/22	(2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **15.11.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **12.06.2012**

(71) Solicitante/s:
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Centro de Innovación e Transferencia de Tecnoloxía. Edificio EMPRENDIA - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES y
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

(72) Inventor/es:
PÁRRAGA MENESES, JENNY;
KONAT ZORZI, GIOVANNI;
PAOLICELLI, PATRIZIA;
SEIJO REY, BEGOÑA;
SÁNCHEZ BARREIRO, ALEJANDRO;
CONTRERAS RUIZ, LAURA y
DIEBOLD LUQUE, YOLANDA

(74) Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

(54) Título: **NANOPARTÍCULAS PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE MUCOSAS**

(57) Resumen:
Nanopartículas para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de mucosas.
La presente invención se refiere a nanopartículas poliméricas las cuales que comprenden un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada de modo que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal, o un plásmido o una construcción genética que lo contenga, y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad que cursa con una deficiencia de mucinas. También se refiere a una composición farmacéutica que comprenda dichas nanopartículas y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad que cursa con una deficiencia de mucinas.

ES 2 382 625 A1

DESCRIPCION

Nanopartículas para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de mucosas.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología, y más concretamente de la biomedicina. Específicamente, se refiere a nanopartículas que comprenden un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal, o un plásmido o una construcción genética que lo contenga, y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad que cursa con una deficiencia de mucinas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las mucosas del organismo son uno de los elementos más sensibles a afecciones tanto inflamatorias como infecciosas. Dentro de estas mucosas, uno de los elementos de mayor importancia son las mucinas. Estas mucinas son un grupo heterogéneo de glucoproteínas de elevado peso molecular y son el elemento fundamental de las secreciones mucosas del organismo. Dentro de este grupo existen descritas al menos 17 proteínas diferentes con diferentes características tanto de expresión como funcionales.

Estas mucinas son especialmente relevantes en el caso de la mucosa ocular, donde las mucinas presentan elevada importancia en la homeostasis del tejido mucoso, así como en la lubricación de los epitelios tanto corneal como conjuntival durante el parpadeo. Además, las mucinas actúan a nivel ocular como estabilizadores de la película lagrimal previniendo la desecación del epitelio y como barrera frente a la entrada tanto de agentes extraños como de patógenos.

Debido a la importancia de estas mucinas, la deficiencia en las mismas lleva aparejados diversos problemas patológicos oculares. Estos problemas afectan fundamentalmente a un conjunto de estructuras presentes en la parte anterior del ojo denominadas en su conjunto “superficie ocular” lo que es considerado una unidad funcional establecida (Stern *et al*, 1998. *Cornea*. 17:584-589). Esta superficie ocular es un tejido mucoso similar a otras mucosas del organismo como la mucosa del tracto gastro-intestinal, la mucosa de las vías respiratorias, la mucosa urinaria y la mucosa vaginal.

Ejemplos de enfermedades que cursan con alteración en la regulación de producción de mucinas son, por ejemplo, enfermedades autoinmunes que cursan con inflamación. En estos casos se puede dar lugar, en función de la enfermedad, a una superproducción o una subproducción de las mucinas características de la superficie ocular. Esta variación de los niveles de las mucinas, hacen que la homeostasis producida por las mismas no se produzca y por lo tanto dé lugar a procesos patológicos graves que pueden tener influencia en la función visual.

Una de las enfermedades de mayor incidencia, en relación con las mucinas y la superficie ocular es el denominado síndrome de ojo seco. Esta enfermedad afecta, por ejemplo, a un 10% de la población adulta (Viso *et al*, 2009. *Ophthalmic Epidemiol*. 16:15-21) alcanzando un 14,6% en la población de más de 65 años (Schein *et al*, 1997. *Am J Ophthalmol*. 124:723-728). Esta enfermedad está fuertemente relacionada con el envejecimiento, así como con el sexo ya que afecta mayoritariamente a mujeres. De este modo, la prevalencia de esta enfermedades puede llegar al 40% en mujeres postmenopáusicas (Schaumberg *et al*, 2003. *Am J Ophthalmol*. 136:318-326).

Otras enfermedades importantes, que no alcanzan la incidencia del síndrome de ojo seco son las enfermedades alérgicas graves como por ejemplo la queratoconjuntivitis atópica (AKC) o la queratoconjuntivitis vernal (VKC), las cuales pueden alcanzar una incidencia del 4,4% y 3,8% respectivamente, del total de pacientes de alergias oculares en Japón (Uchio *et al*, 2008. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 246:291-296). En otros estudios, la incidencia alcanza un 40% en el caso de la queratoconjuntivitis atópica y un 46% en el caso de la queratoconjuntivitis vernal, del total de pacientes de alergias oculares en Brasil (Belfort *et al*, 2000. *Acta Ophthalmol Scand*. 78: 38-40). En todas estas enfermedades se han visto alteraciones en los niveles de expresión de mucinas (Argüeso *et al*, 2002. *Invest Opththalmol Vis Sci*. 43:1004-1011; Dogru *et al*, 2005. *Curr Eye Res*. 30:897-908). Por otro lado, algunas patologías de la mucosa ocular, pueden ser producidas por el uso continuo de lentes de contacto, las cuales pueden dar lugar a inflamación subclínica y por ello a la disminución de la producción de mucinas (Corrales *et al*, 2009. *Optom Vis Sci*. 86:1051-1058), lo que supone un gran impacto tanto sanitario como social.

Dentro de las mucinas, una de las de mayor relevancia clínica es la mucina MUC5AC, la cual es específica de las células caliciformes de la conjuntiva. La producción de mucina por estas células se encuentra fuertemente disminuida (hasta un 90% de reducción) en diversas enfermedades oculares como por ejemplo la queratoconjuntivitis *sicca*, el síndrome de Sjögren, el penfigoide, el síndrome de Stevens Johnson (Kunert *et al*, 2001. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42: 2483-2489), en pacientes atópicos con úlceras corneales (Dogru *et al,* 2005. *Cornea* 24: S18-S23; Dogru *et al,* 2005. *Curr Eye Res*. 30: 897-908) También puede verse reducida como consecuencia del desarrollo de síntoma de ojo seco secundario a otras enfermedades o tratamientos oculares (Heimann *et al,* 2001. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 239: 488-495). Igualmente, la exposición pasiva al humo del tabaco produce una reducción significativa en los niveles de MUC5AC (Rummenie *et a,.* 2008. *Cytokine* 43: 200-208).

En la actualidad no existen tratamientos que permitan la recuperación funcional de la superficie ocular inflamada de forma crónica, sino que los tratamientos existentes solo presentan utilidad para aliviar la sintomatología de las enfermedades. Resulta necesaria la búsqueda de un tratamiento que permita la recuperación de la enfermedad, para lo

cual una buena aproximación puede ser el tratamiento de la inflamación subyacente, permitiendo una normalización de la superficie ocular que finalmente permita recuperar los niveles de los componentes que se encuentren alterados. Dentro de esta recuperación de los niveles podría encuadrarse una terapia que permita la recuperación funcional de los niveles de las mucinas.

Debido al elevado absentismo laboral producido por las molestias oculares y la disminución de las facultades visuales, así como al daño psicológico asociado a la pérdida de visión que producen estos problemas crónicos, y a la ausencia de tratamientos efectivos, resultaría altamente beneficioso el desarrollo de una terapia génica que permita una recuperación funcional de las células productoras de mucinas. Esto conllevaría un restablecimiento de los niveles de las mismas y por tanto una recuperación de las enfermedades visuales asociadas a este defecto.

El desarrollo de terapias génicas se ha visto perjudicado por la búsqueda de objetivos muy ambiciosos mediante los cuales se ha tratado de conseguir una respuesta sistémica a los tratamientos genéticos. Sin embargo, un tratamiento más local, permitiría un desarrollo más sencillo de la terapia, y con ello unos mejores resultados mediante una respuesta terapéutica eficiente.

Uno de los mayores problemas a los que se ha enfrentado la terapia génica ha sido el desarrollo de vehículos adecuados. La aproximación a una terapia sistémica resulta compleja y difícil, ya que son múltiples las barreras existentes, y de muy diferente naturaleza dentro de un organismo. Sin embargo un enfoque más local permite reducir las barreras y simplifica la búsqueda del vehículo. Aun a pesar de ello, la necesidad de vehículos adecuados ha sido el mayor problema de la terapia génica (Nathan Blow, 2007. *Nature*. 450:1117-1120).

En la actualidad, entre los vehículos más prometedores para el transporte de material genético se encuentran los sistemas nanoparticulares elaborados a base de biomateriales. Estos presentan un gran potencial, aunque hasta la fecha no han proporcionado los resultados esperados. Por ello, resulta necesario el desarrollo de nuevos sistemas capaces de aprovechar su potencial (Friede *et al*, 2005. *Adv Drug Deliv Rev*. 57:325-331).

Uno de los polímeros más utilizados es el quitosano, el cual es un polímero citado como esencial en la formación de nanopartículas mediante reticulación iónica. Las nanopartículas de quitosano están siendo cuestionadas ya que existen estudios que cuestionan su utilidad frente a simples disoluciones de las moléculas bioactivas con el polímero (Dyer *et al*, 2002. *Pharm Res*. 19:998-1008). Además, también se ha señalado la posible citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano (Loretz *and* Bernkop-Schnürch, 2007. *Nanotoxicology*. 1:139-148).

Existe por tanto la necesidad de desarrollar sistemas nanoparticulares partiendo de materiales y reactivos biocompatibles de baja citotoxicidad que proporcione un alto control en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, que puedan ser obtenidos mediante procedimientos sencillos y eficaces, y que sean capaces de asociar eficazmente material genético y de conseguir un adecuado efecto biológico con el mismo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere nanopartículas útiles para la elaboración de un medicamento que permita la recuperación de la producción de mucinas. Dichas nanopartículas llevan asociadas un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada, una construcción genética o un vector que contengan dicho polinucleótido. Esta composición permite la recuperación de la producción de mucinas, por lo que presenta utilidad para el desarrollo de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de las mucosas asociadas a una deficiencia de mucinas.

En la presente invención se demuestra cómo los inventores han desarrollado un plásmido que incluye un polinucleótido capaz de codificar una mucina, el cual puede ser asociado a nanopartículas. Cuando el sistema nanoparticular con el plásmido asociado, se pone en contacto con células humanas, las nanopartículas actúan como vehículos del material genético, sin presentar actividad citotóxica, y permiten que las células produzcan la mucina codificada por el plásmido. Además, en la presente invención se demuestra la capacidad de la composición para recuperar la producción de lágrima en ratones con ojo seco inducido, demostrando la utilidad de dicha composición para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades de mucosas que cursan con déficit de mucinas.

Por otro lado cabe indicar que la similaridad entre las mucinas, permite que una mucina pueda sustituir, al menos parcialmente, la funcionalidad de otras, en caso de deficiencia de alguna de ellas. Por ello la composición de la presente invención serviría para el tratamiento de enfermedades de mucosas que cursan con déficit de mucinas.

En la presente invención se ha asociado un plásmido que integra una secuencia que codifica para la proteína MUC5AC modificada (cuya secuencia es SEQ ID NO:1), la cual se corresponde con los extremos C y N terminal de la proteína MUC5AC nativa. Esta secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:2) que codifica para la mucina modificada es sustancialmente más corta (7,7 kilobases) que la secuencia codificante de la mucina completa (16 kilobases), lo que presenta como ventaja una mayor facilidad para su clonaje en plásmidos, construcciones genéticas o vectores. Esta secuencia codificante más corta, codifica para la mucina MUC5AC que presenta fusionados los extremos C-terminal y N-terminal, y que mantiene los dominios de mayor importancia de la proteína original como son el dominio de dimerización (presente en el extremo C-terminal), el dominio de polimerización, algunos de los diferentes puntos de glicosilación existentes en la proteína completa, y el péptido señal para su correcta conducción por la vía secretora. Esta proteína, por tanto,

presenta el extremo N terminal de la MUC5AC (aminoácidos 1-2.448) unido al dominio de dimerización presente en el extremo C-terminal (aminoácidos 5.220-5.333), eliminando la región central donde se encuentran las secuencias altamente repetidas ricas en prolina, treonina y serina (PTS). En la presente invención se demuestra que dicha proteína MUC5AC modificada es útil para tratar enfermedades que cursan con deficiencia de mucinas como por ejemplo el síndrome del ojo seco.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a nanopartículas poliméricas, de ahora en adelante nanoparticulas de la invención, que comprenden un polinucleótido que codifica una proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal.

La expresión “proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal” se refiere a una proteína que presenta el extremo N terminal de la MUC5AC que incluye tanto el dominio de polimerización, como el péptido señal para su correcta conducción por la vía secretora, con el dominio de dimerización del extremo C-terminal de la proteína MUC5AC. Un ejemplo de proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal es, por ejemplo, aunque sin limitarse, la proteína de secuencia SEQ ID NO:1, la cual presenta los aminoácidos 1-2.448 de la proteína MUC5AC (correspondientes al extremo N-terminal) unidos a los aminoácidos 5.220-5.333 (correspondientes al dominio de dimerización del extremo C-terminal). De igual forma que ocurre con muchas proteínas, como por ejemplo entre proteínas homólogas en diferentes organismos, un polipéptido podría presentar variaciones en la secuencia aminoacídica respecto a la descrita a modo de ejemplo sin que se produjera una alteración sustancial en la proteína. Esto significa que esta variación no sería determinante en el polipéptido ni para su estructura ni para su actividad. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones se dan entre aminoácidos que presentan similares características como por ejemplo en cuanto a polaridad, tamaño o carga, e incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre Lisina (Lys) y Arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente como por ejemplo mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones en las características o propiedades esenciales del polipéptido, por lo que dichas variantes mantienen su misma actividad biológica. Por otro lado, adiciones, o deleciones de pocos aminoácidos en los extremos de las secuencias seleccionadas para dar lugar a la proteína del ejemplo tampoco provocarían modificaciones sustanciales en cuanto a tamaño o funcionalidad de la misma, por lo que también se encontrarían dentro de la expresión “proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal”. Por todo ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal presenta al menos un 90%, preferiblemente un 95%, más preferiblemente un 98% de identidad de con respecto a SEQ ID NO:1. En una realización más preferida la proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal es SEQ ID NO:1.

Por otro lado, un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal sería todo aquel polinucleótido que codifique para una proteína o polipéptido incluido bajo la denominación “proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal”. Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Un ejemplo de polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal sería por ejemplo, aunque sin limitarse, el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO:2. Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren por tanto a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra. El polinucleótido de la invención puede encontrarse en la naturaleza y obtenerse por aislamiento mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, u obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación. El polinucleótido, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5’ o 3’, sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido presenta al menos un 90%, preferiblemente un 95%, más preferiblemente un 98% de identidad con respecto a SEQ ID NO:2. En una realización más preferida el polinucleótido es SEQ ID NO:2.

Los términos “péptido", “polipéptido”, “proteína” o “secuencia aminoacídica” se usan de forma intercambiable en la presente invención, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al*. 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 287 Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al*. 1999, *J. Mol. Biol*. 215: 403-410). Adicionalmente, el algoritmo de Smith Waterman debe usarse para determinar el grado de identidad de dos secuencias.

El polinucleótido que codifica para la proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal, puede encontrarse incluido en construcciones génicas o vectores. Por ello una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a nanopartículas que comprenden un polinucleótido que codifica una proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal, donde el polinucleótido se encuentra incluido en una construcción genética o un vector. En una realización más preferida de primer aspecto de la invención, el vector en el que se encuentra incluido el polinucleótido es un plásmido.

La construcción genética puede llevar incluidas secuencias de control unidas operativamente al polinucleótido. El término “secuencia de control”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a secuencias nucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. Ejemplos de secuencias de control, son por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación o activadores transcripcionales.

La expresión “unidos operativamente”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes trp, recA, lacZ, lacI, tet, gal, trc, o tac de E. coli, o el promotor del gen α-amilasa de B. subtilis. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado “upstream” de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica. Tanto el polinucleótido de la invención como la construcción genética de la invención que comprende el polinucleótido, pueden introducirse, por ejemplo, en un vector de clonación o un vector de expresión para permitir su replicación o su expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión del péptido de la invención.

El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura. El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se encuentra, generalmente, unido operativamente a secuencias control.

El término “expresión” se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o polipéptido. La expresión puede tener lugar en una célula hospedadora, pero también mediante cualquier proceso de expresión proteica *in vivo*.

Las nanopartículas pueden formarse mediante un mecanismo de interacción iónica que provoca la precipitación conjunta de los componentes en forma de nanoclusters como consecuencia de la adición de un agente reticulante que presenta carga eléctrica. El procedimiento de interacción iónica presenta como ventajas que no requiere el uso de elementos químicos diferentes a los componentes de las propias nanopartículas que puedan provocar toxicidad o incompatibilidad del sistema. El uso de un agente reticulante iónico permite el entrecruzamiento del polímero iónico dando lugar a las nanopartículas. Este procedimiento es un proceso rápido y fiable, económico y fácilmente escalable para la producción industrial.

Por ello, en otra realización preferida del primer aspecto de la invención, las nanopartículas están formadas por:

i) al menos un polímero dotado de carga eléctrica, y

ii) un agente reticulante iónico.

Ejemplos de polímeros útiles para la formación de las nanopartículas son por ejemplo, aunque sin limitarse, acido hialurónico o sales del mismo, ácido colomínico o derivados, glucomanano o derivados, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dextrano, sulfato de dermatano, heparina, carragenina, gelano, albúmina, colágeno o gelatina. Dentro de estos polímeros también se incluyen polímeros sobre los que se han realizado modificaciones tales como fragmentación enzimática, fragmentación química o derivatización mediante, por ejemplo, aunque sin limitarse, la anionización o cationización del polímero de forma previa a la elaboración de las partículas. Esto polímeros pueden presentar un origen natural, semisintético o sintético. Resulta interesante que los polímeros utilizados sean polímeros naturales o semisintéticos ya que esto permite minimizar en mayor medida el posible rechazo de los individuos tratados a las nanopartículas. Por ello, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el polímero de (i) es un polímero natural o semisintético.

Dentro de los polímeros de (i), uno de los que proporciona mejores resultados es la gelatina cationizada. Por todo ello, en una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el polímero de origen natural dotado de carga eléctrica (i) es gelatina cationizada.

Ejemplos de agentes reticulantes iónicos son por ejemplo, aunque sin limitarse, fosfatos, sulfatos, citratos o sales de los mismos, espermina o sales de la misma, o espermidina o sales de la misma. Estos agentes presentan diferentes cargas eléctricas (fosfatos, sulfatos y citratos carga aniónica; espermina y espermidina carga catiónica). Dentro de estos, uno de los mejor caracterizados y que mejor resultado proporciona son los tripolifosfatos. Por todo ello, en otra realización más preferida de este aspecto de la invención, el agente reticulante iónico (ii) es un tripolifosfato. En una realización aun más preferida el agente reticulante iónico es tripolifosfato sódico.

Opcionalmente, las nanopartículas pueden comprender un elemento adicional, el cual es un polímero iónico de carga eléctrica opuesta al primer polímero de las nanopartículas. La adición de este polímero permite una mejor gelificación iónica, y permite modificar las características de las nanopartículas obtenidas tanto en tamaño, como en características estructurales y carga eléctrica superficial. Por todo ello, en una realización más preferida del primer aspecto de la invención, las nanoparticulas están formadas además por un elemento (iii) el cual es al menos un polímero de carga opuesta al polímero (i).

Ejemplos de polímeros pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse, acido hialurónico o sales del mismo, ácido colomínico o derivados, glucomanano o derivados, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dextrano, sulfato de dermatano, heparina, carragenina, gelano, albúmina, colágeno o gelatina. En una realización aun más preferida el polímero (iii) de carga opuesta al polímero (i) es sulfato de dextrano o sulfato de condroitino.

Debido a la formación de las nanopartículas mediante reticulación iónica el polinucleótido, ya sea de forma independiente o incluido en un vector o una construcción génica, puede quedar retenido en el interior de las mismas mediante atrapamiento puramente físico, debido a la diferencia del tamaño de éste y el de la malla formada en dicho proceso de reticulación. Por otro lado, debido al carácter iónico de los polímeros utilizados, ya sea en (i) o en (iii), el polinucleótido puede quedar también unido a las nanopartículas a consecuencia de una interacción electrostática entre éste y dichos polímeros..

En la presente invención se entiende por “nanopartícula” un sistema estable, de características homogéneas reproducibles y modulables, perfectamente diferenciables de sistemas autoensamblados, que se forman como consecuencia de un proceso controlado de entrecruzamiento ionotrópico del polímero dotado de carga constitutivo de las mismas mediado por agentes reticulantes iónicos. La interacción electrostática que resulta entre los diferentes componentes de las nanopartículas en el proceso de reticulación genera entidades físicas características, que son independientes y observables, cuyo tamaño promedio es inferior a 1 µm.

Se entiende por “tamaño promedio” en la presente invención, el diámetro promedio de las nanopartículas, el cual puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por un experto en la materia, como por ejemplo, aunque sin limitarse, el utilizado en los ejemplos de la presente invención. Las nanopartículas de la invención presentan un tamaño promedio de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 50 y 600 nm, y más preferiblemente entre 100 y 400 nm. Este tamaño promedio de las partículas se encuentra influido por la composición de las mismas, así como por las condiciones ambientales en las que se forman.

Las nanopartículas pueden presentar diferentes cargas eléctricas superficiales (potencial Z) en función de la composición de las mismas, y de las proporciones de cada uno de los elementos. Esta carga puede presentar valores positivos, negativos o valor 0, preferiblemente, la carga eléctrica de las nanopartículas es de entre +50 mV y -50mV, más preferiblemente entre +45 y 0mV, y aun más preferiblemente entre +40 y +10mV. La medición de la carga eléctrica puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo el utilizado en los ejemplos de la presente invención.

Las nanopartículas, una vez se han formado y presentan el polinucleótido asociado, pueden someterse a un proceso de liofilización para permitir su preservación durante el almacenamiento manteniendo sus características originales y permitiendo el manejo de menores volúmenes. Esta liofilización puede aumentar levemente la reticulación de las partículas. Para la liofilización es necesaria la previa adición de moléculas que actúen como crioprotectores o lioprotectores como por ejemplo, aunque sin limitarse, glicoles, o azúcares como glucosa, sacarosa o trealosa a una

concentración de entre 1 y 5%. Por todo ello, en otra realización preferida, las nanopartículas de la invención se encuentran en forma liofilizada.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento o alternativamente a las nanopartículas de la invención para su uso como medicamento.

Como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, las nanopartículas de la invención presentan utilidad en la recuperación de la producción de mucinas por células del organismo. Por ello otro aspecto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, o alternativamente a las nanopartículas de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina.

Se entiende por "enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina" en la presente invención toda aquella patología que se produce por, o lleva asociada una disminución total o parcial de la producción de mucinas en las mucosas. Dentro de estas enfermedades se incluyen por ejemplo, aunque sin limitarse, enfermedades que afectan a la mucosa ocular y/o a otras mucosas del organismo, como el síndrome de insuficiencia límbica, la queratitis neurotrófica, la queratitis herpética, la quemadura por álcalis, la quemadura térmica, la quemadura por radiación, el síndrome de Steven-Johnson, la necrosis epidérmica tóxica, los pénfigos, el penfigoide de las membranas mucosas, las alergias oculares, la queratoconjuntivitis vernal, la queratoconjuntivitis atópica, la queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, las conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, el Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes (como la esclerodermia, la mesenquimopatía, el lupus, la artritis reumatoide, las miopatías o la cirrosis viral primaria), la atopia, la enfermedad injerto-contra huésped, la hipofunción glandular salivar y xerostomía, y la ictiosis.

En los ejemplos de la presente invención se demuestra que en células presentes en la mucosa ocular, el uso de las nanopartículas que comprenden un plásmido que lleva un polinucleótido que codifica para la proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal, permite la expresión de esta mucina. Por ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular, o alternativamente a las nanopartículas para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular.

En la presente invención se demuestra que las nanopartículas de la invención permiten la recuperación de la producción lagrimal en una enfermedad que cursa con deficiencias en mucinas, y más concretamente con deficiencia en la mucina MUC5AC. Por todo ello otra realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucina es MUC5AC, o alternativamente a las nanopartículas para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucina es MUC5AC. En una realización más preferida de la invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular y la mucina es MUC5AC, o alternativamente a las nanopartículas de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular y la mucina es MUC5AC.

Otra realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina se selecciona de la lista que comprende: síndrome de insuficiencia límbica, queratitis neurotrófica, queratitis herpética, quemadura por álcalis, quemadura térmica, quemadura por radiación, síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, pénfigos, penfigoide de las membranas mucosas, alergias oculares, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes (como la esclerodermia, la mesenquimopatía, el lupus, la artritis reumatoide, las miopatías o la cirrosis viral primaria), atopia, enfermedad injerto-contra huésped, hipofunción glandular salivar, xerostomía, o ictiosis, o alternativamente a las nanopartículas de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina se selecciona de la lista que comprende: síndrome de insuficiencia límbica, queratitis neurotrófica, queratitis herpética, quemadura por álcalis, quemadura térmica, quemadura por radiación, síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, pénfigos, penfigoide de las membranas mucosas, alergias oculares, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes (como la esclerodermia, la mesenquimopatía, el lupus, la artritis reumatoide, las miopatías o la cirrosis viral primaria), atopia,

enfermedad injerto-contra huésped, hipofunción glandular salivar, xerostomía, o ictiosis,. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina es síndrome de ojo seco, o alternativamente a las nanopartículas de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina es síndrome de ojo seco.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende las nanopartículas de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización más preferida de este aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende, además, otro principio activo. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende, además, otro principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “substancia activa”, “substancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica, un efecto metabólico, un efecto inmunológico u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del ser humano u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al ser humano, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

La composición de la invención es especialmente ventajosa para constituir una composición líquida o cualquier composición que comprenda las nanopartículas de la invención y que se encuentre en forma de gel, crema, pomada, o bálsamo para su uso tópico.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al ser humano, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, a oral, bucal, sublingual, ocular, nasal, pulmonar, ótica, intrauterina, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter. Las nanopartículas de la invención, debido a su utilidad en las mucosas presentan una administración ventajosa por diferentes vías mucosas como por ejemplo, aunque sin limitarse, mucosa ocular, mucosa del tracto gastro-intestinal completo incluyendo la bucal u oral, mucosa de las vías respiratorias, incluyendo la mucosa nasal y la bronquial, la mucosa urinaria y la mucosa vaginal. Por todo ello una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de la invención para su administración vía mucosa ocular, mucosa del tracto gastro-intestinal completo, mucosa de las vías respiratorias, la mucosa urinaria y la mucosa vaginal.

Las nanopartículas, pueden someterse a un proceso de liofilización para permitir su preservación durante el almacenamiento manteniendo sus características originales y permitiendo el manejo de menores volúmenes. Por ello, en otra realización preferida la composición farmacéutica se encuentra en forma liofilizada.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

Los “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en las composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

Otro aspecto de la invención se refiere al se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento o alternativamente a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, o alternativamente a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular, o alternativamente a la composición farmacéutica para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucina es MUC5AC, o alternativamente a la composición farmacéutica para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucina es MUC5AC. En una realización más preferida de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular y la mucina es MUC5AC, o alternativamente a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la mucosa es la mucosa ocular y la mucina es MUC5AC.

Otra realización preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina se selecciona de la lista que comprende: síndrome de insuficiencia límbica, queratitis neurotrófica, queratitis herpética, quemadura por álcalis, quemadura térmica, quemadura por radiación, síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, pénfigos, penfigoide de las membranas mucosas, alergias oculares, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes (como la esclerodermia, la mesenquimopatía, el lupus, la artritis reumatoide, las miopatías o la cirrosis viral primaria), atopia, enfermedad injerto-contra huésped, hipofunción glandular salivar, xerostomía, o ictiosis, o alternativamente a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina se selecciona de la lista que comprende: síndrome de insuficiencia límbica, queratitis neurotrófica, queratitis herpética, quemadura por álcalis, quemadura térmica, quemadura por radiación, síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, pénfigos, penfigoide de las membranas mucosas, alergias oculares, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes (como la esclerodermia, la mesenquimopatía, el lupus, la artritis reumatoide, las miopatías o la cirrosis viral primaria), atopia, enfermedad injerto-contra huésped, hipofunción glandular salivar, xerostomía, o ictiosis,. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina es síndrome de ojo seco, o alternativamente a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina, donde la enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina es síndrome de ojo seco.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las nanopartículas que comprende:

1) preparar una disolución acuosa de al menos un polímero iónico,

2) preparar una disolución de un reticulante iónico,

3) mezclar mediante agitación las disoluciones de (1) y (2) lo que da lugar a la formación de las nanopartículas.

Este método de producción es un método rápido, económico, reproducible y escalable, lo que permite su implantación industrial. Además, la ausencia de elementos químicos diferentes a los constitutivos de las nanopartículas, así como el

uso de condiciones suaves para la producción, permite una mayor seguridad de las partículas resultantes. Para llevar a cabo la asociación de la molécula de ADN, ésta se disuelve en la disolución del polímero o del agente reticulante, en función de la carga eléctrica de cada uno de estos componentes. El ADN se incorpora en la disolución que presente carga negativa.

Opcionalmente se podría incorporar un polímero de carga opuesta al del paso (1), bien en el paso (3), o bien posteriormente una vez formadas las nanopartículas.

La incorporación de los polímeros se lleva a cabo mediante una disolución acuosa del mismo a una concentración de entre 0,1 y 6 mg/mL, preferiblemente entre 0,1 y 5 mg/mL. Por otro lado, el agente reticulante se incorpora mediante una disolución acuosa del mismo a una concentración de entre 0,0625 y 1,5 mg/mL, preferiblemente entre 0,25 y 1,5mg/mL.

Mediante este procedimiento se lleva a cabo la formación de las nanopartículas, permitiendo el control tanto del proceso de entrecruzamiento como del tamaño y la carga superficial de las partículas resultantes. Además se permite la reproducibilidad de las partículas resultantes.

Posteriormente a la formación de las nanopartículas, éstas pueden someterse a un proceso de liofilización para permitir su preservación durante el almacenamiento manteniendo sus características originales y permitiendo el manejo de menores volúmenes. Esta liofilización puede aumentar la reticulación de las partículas. Para la liofilización es necesaria la previa adición de moléculas que actúen como crioprotectores o lioprotectores como por ejemplo, aunque sin limitarse azúcares como glucosa, sacarosa o trealosa a una concentración de entre 1 y 5%.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de los plásmidos A: pIRES2-AcGFP1- MUC5AC-280; y B: pMUCIN5AC-29. **MAO151** y **MAO153**: cebadores; **PMCMV**: promotor de citomegalovirus; **pUC ori**: origen de replicación pUC; **HSV TK poly A**: señal de poliadenilación de la timidina kinasa del virus *herpex simplex*; **KanR/NeoR**: resistencia a kanamicina y neomicina; **SV40 ori/p**: origen de replicación de SV40; **f1 ori**: origen de replicación f1; **AcGFP1**: *Aequorea coerulescens* green fluorescent protein; **IRES**: sitio interno de entrada al ribosoma; **MUC5AC ORF**: marco de lectura de MUC5AC; SacI: punto de corte de la enzima de restricción SacI; EcoRV: punto de corte de la enzima de restricción EcoRV.

Figura 2. Imagen de gel de agarosa. Resultados de la digestión de 0,5 microlitros de la preparación de pMUCIN5AC-29 con las enzimas SacI y EcoRV y sus respectivos controles negativos (-) sin digerir con la enzima.

Figura 3. Caracterización morfológica de las nanopartículas por microscopia electrónica de transmisión. (A) nanopartículas GCspm137:TPP; (B) nanopartículas GCspm137:CS:TPP; (C) nanopartículas GCspm137:DS:TPP.

Figura 4. Imagen del gel de electroforesis en agarosa al 1% cargado con: (A) Plásmido pMUC5AC-280 libre; (B) nanopartículas GCspm137:TPP, (C) nanopartículas GCspm137:CS:TPP; (D) nanopartículas GCspm:DS:TPP.

Figura 5. Valores de viabilidad celular obtenidos mediante el test XTT en A: células humanas de córnea (HCE) o B: de conjuntiva (IOBA-NHC). (C) Control no tratado; (C+) control positivo de muerte celular (tratado con disolución de cloruro de benzalconio 1%); (F1) nanopartículas GCspm137:TPP; (F2) nanopartículas GCspm137:CS:TPP; (F3) nanopartículas GCspm137:DS:TPP.

Figura 6. Expresión de MUC5AC relativa al control, a nivel de ARNm en células 72h post-transfección en A: células humanas de córnea (HCE) o B: células humanas de conjuntiva (IOBA-NHC). (Control) Control no tratado; (JetPEI+pEGFP) Control negativo de transfección; (JetPEI+pMUC5AC) Control positivo de transfección; (F1) nanopartículas GCspm137:TPP; (F2) nanopartículas GCspm137:CS:TPP; (F3) nanopartículas GCspm137:DS:TPP"

Figura 7. Expresión de la proteína MUC5AC relativa al control en células 72h post-transfección en A: células humanas de córnea (HCE) o B: células humanas de conjuntiva (IOBA-NHC). Control no tratado (Control); Control negativo de transfección (JetPEI+pEGFP); Control positivo de transfección (JetPEI+pMUC5AC); nanopartículas GCspm137:TPP (F1); nanopartículas GCspm137:CS:TPP (F2); nanopartículas GCspm137:DS:TPP (F3).

Figura 8. Producción de lágrima en animales no sometidos a inducción de ojo seco y no tratados (Control), en animales con ojo seco inducido y no tratados (Control Ojo Seco), en animales con ojo seco inducido y tratados con pMUC5AC libre (Ojo Seco + pMUC5AC libre), en animales con ojo seco inducido y tratados con nanopartículas blancas (sin plásmido asociado) (Ojo Seco + NPs blancas), en animales con ojo seco inducido y tratados con nanopartículas asociando pMUC5AC (Ojo Seco + pMUC5AC-NPs) y en animales con ojo seco inducido y tratados con formulación comercialmente disponible para el tratamiento del ojo seco (Ojo Seco + Restasis®). Para cada tratamiento se muestran

los valores basales de producción de lágrima (tiempo cero; primera columna); los obtenidos tras la inducción de ojo seco (día 5; segunda columna) y los obtenidos al término del tratamiento (día 10; tercera columna). * diferencia significativa con respecto a los valores basales ($p<0,05$). # diferencia significativa con respecto a los valores en animales con ojo seco inducido ($p<0,05$) (n=8, divididos en dos grupos independientes de 4 animales cada uno).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Materiales y métodos.

Como procedimiento común a los ejemplos detallados a continuación, se ha caracterizado a las nanopartículas desde el punto de vista del tamaño, el potencial zeta (o carga superficial) y la eficacia de encapsulación.

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

La gelatina con espermina ha sido sintetizada según el método descrito por Seki *et al*, (2006. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95,1393-1401). Para ello se preparó una disolución de gelatina al 1% p/v (100mg de gelatina 10 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 5,3), a la que se añadieron 1620 mg de espermina y 267,5 mg de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida hidroclorhidrato (EDC). Seguidamente se ajustó el pH (pH=4,5) a un valor de pH=5 con NaOH, y el conjunto se dejó reaccionar durante 18 h en baño termostatizado, a 37±1ºC. Posteriormente el conjunto se dializó y se liofilizó, obteniendo así la gelatina cationizada con espermina que se empleó en los experimentos que se recogen en los correspondientes ejemplos.

La determinación del punto isoiónico o isoeléctrico consiste en medir la concentración de iones hidrógeno de una solución del polímero que ha sido desmineralizada mediante el contacto con resinas de intercambio iónico (*Commission on Methods for Testing Photographic Gelatin*. PAGI METHOD 10th Ed. 2006). El proceso consiste en colocar una solución al 1% de la proteína cationizada en contacto con una mezcla de resinas ácida catiónica y básica aniónica en proporciones 1:2. Previamente estas resinas de intercambio se trataron mediante lavados con agua milliQ a 35 ºC y, a continuación, se pusieron en contacto con la solución de proteína modificada bajo agitación a 35 ºC, durante 30 minutos. A continuación se decanta la solución y se mide el pH a 35ºC. El valor obtenido indica el punto isoiónico o isoeléctrico de la proteína. Como control se han empleado gelatinas comerciales de puntos isoeléctricos 9 y 5.

El tamaño de partícula ha sido determinado mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y haciendo uso, para ello, de una Zeta Sizer (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 mili-Q.

El potencial Zeta partícula ha sido determinado mediante la técnica de anemometría por dispersión de láser (LDA) y haciendo uso, para ello, de una Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Para ello las muestras fueron convenientemente diluidas en una disolución milimolar de KCl.

Para la evaluación de la morfología de las nanopartículas, se ha empleado microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un JEOL JEM-1011 (Jeol, Japón) utilizando ácido fosfotúngstico al 1% como agente de contraste.

La eficiencia de asociación de material genético a las nanopartículas ha sido determinada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA, Tris 40mM, Ácido acético 1%, EDTA 1mM) pH 8 con bromuro de etidio (10 mg/mL, 5 µL) y se utilizó un tampón de carga y marcador de migración compuesto de glicerina (30%). Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V durante 120 minutos y se empleó material genético libre como control.

Para el análisis cuantitativo de la asociación del plásmido a las nanoestructuras, se utilizó el método del Picogreen® (Invitrogen, ES), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en sobrenadantes de las formulaciones previamente centrifugadas en centrífuga Microfuge 22R (Beckman Coultern, US) a 12.000 rpm a 4ºC durante 30 minutos.

Para los experimentos de cultivos celulares fueron empleadas dos líneas: células humas de córnea HCE (*Human Corneal Epithelium*) y células humanas de conjuntiva IOBA-NHC (*Normal Human Conjunctiva*). Las células HCE fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS), 0,5% de DMSO, toxina colérica (1 mg/mL), factor de crecimiento endotelial (EGF; 100 µg/mL), insulina (4 mg/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL) y penicilina (100 U/mL) (Invitrogen, ES). Las células IOBA-NHC fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), toxina colérica (1 mg/mL), factor de crecimiento endotelial (EGF; 2 ng/mL), insulina (10 mg/mL), hidrocortisona (50 µg/mL), fungizona (250 µg/mL), estreptomicina/penicilina (5000 U/mL) (Invitrogen, ES). Las células fueron mantenidas a 37ºC bajo una atmósfera humidificada de 5% de CO_2.

Para los ensayos de viabilidad celular, fue empleado el test XTT que está basado en la conversión de la sal tetrazólica en un formazán soluble por las células viables (n=3, experimentos independientes realizados en octuplicados). La medida de absorbancia fue realizada a 450 nm con la longitud de onda de referencia de 620 nm, en un multilector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, US), expresando los resultados en % de viabilidad relativa al control.

Para la cuantificación relativa de la expresión del ARNm correspondiente a la MUC5AC-, fue empleada la RT-PCR, utilizando el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como referencia.. El ARNm fue extraído y purificado con RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) y cuantificado con Quant-it RNA Assay Kit (Invitrogen, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc fue construido con SuperScript®Villo cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, US) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los parámetros de la RT-PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95ºC durante 10 minutos; un segundo paso de desnaturalización y extensión, con 40 ciclos, de 15 segundos a 95ºC y 60 segundos a 60ºC, haciendo uso de 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, US).

La MUC5AC fue cuantificada por ELISA. Se utilizó como estándar el análogo B de la MUC5AC (AnaSpec, US). Para ello se incubaron en placas de 96 pocillos, 50µL de lisados celulares con 50µL de tampón bicarbonato 0,05M pH 9,6 a 37ºC *over night*. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS y bloqueadas con 2% de albúmina de suero bovino (BSA fracción V) (Sigma-Aldrich, España) durante 1h a temperatura ambiente. Las placas fueron nuevamente lavadas tres veces con PBS e incubadas con 100µL de anticuerpo de ratón anti-MUC5AC (Chemicon, US) (1:500) que fue diluido en PBS conteniendo 0,05% de Tween 20. Después de una hora, los pocillos fueron lavados tres veces con PBS y, a continuación, se añadió sobre ellos 100 µL de IgG de burro anti-ratón conjugada con peroxidasa diluido (1:10.000) en PBS conteniendo 0,05% de Tween 20 y 0,1% de BSA. Después de una hora, las placas fueron lavadas tres veces con PBS. La reacción de color fue desarrollada con el reactivo peróxido de 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidina (TMB), tal y como describe el correspondiente fabricante (Invitrogen, ES). La absorbancia fue leída a 450 nm en lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, US). Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a la cantidad total de proteína y los resultados se expresaron como producción de mucinas relativa al control.

La secuencia de la construcción plasmídica codificadora de MUC5AC se verificó por secuenciación.

La identificación del plásmido codificador de mucina administrado de forma exógena, sólo o asociado a las nanopartículas, en el interior de células humanas de la superficie ocular se hizo mediante microscopía de fluorescencia, evaluando la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. La valoración de un posible efecto tóxico sobre las células humanas como consecuencia de esa administración se realizó mediante un test de medida de la toxicidad estándar (XTT).

La medida de la cantidad de mucina producida en las células como consecuencia de la administración de la invención se hizo mediante dos técnicas complementarias: RT-PCR a tiempo real y un test de ELISA.

Reactivos:

Los siguientes polímeros, tal y como se utilizan en los ejemplos, fueron adquiridos a diferentes casas comerciales: gelatina (Nitta Gelatin Canada Inc., Canadá), sulfato de condroitino (Calbiochem, US), sulfato de dextrano (Sigma-Aldrich, España). El plásmido de ADN pEGFP fue adquirido a Elim Biopharmaceuticals (US). El plásmido de ADN pIRES2-AcGFP1-Mucin-5AC-280 fue sintetizado en Biomedal (España). El tripolifosfato sódico y citrato de sodio fueron adquiridos a Sigma Aldrich (España).

Ejemplo 1. Desarrollo de un plásmido ADN codificador de una mucina y de una proteína fácilmente identificable.

Se desarrolló un plásmido ADN codificador de una mucina, concretamente la mucina MUC5AC, y de una proteína fácilmente identificable, concretamente la proteína verde fluorescente GFP. Ello tuvo lugar a partir de oligonucleótidos sintéticos, de la secuencia de ADN conteniendo la región codificante de un polipéptido de secuencia derivada de la proteína humana MUC5AC. La secuencia de ADN, optimizada para su expresión en células de mamífero, se clonó en un vector de clonación bacteriano, se secuenció y transfirió al vector de expresión pIRES2-AcGFP1, que ya contiene la secuencia que codifica para GFP (Clontech).

Concretamente, a partir de la ORF (*Open Reading Frame*) diseñada, se sintetizó una secuencia de 7660 pares de bases, que además incorporaba una secuencia Kozak (GCCACCATG), dos codones de stop adicionales (TAATAG) y dianas para la enzima de restricción SacI (GAGCTC) en ambos extremos. Esta secuencia se insertó en el vector de clonación de *E. coli* pUC57, dando lugar al plásmido de 10437 pares de bases pUC57-MUC5AC (SEQ ID NO:3). Finalmente, una vez secuenciada la región de pUC57-MUC5AC correspondiente a MUC5AC, se escindió el fragmento SacI de 7754 pares de bases que la contiene y se clonó éste, en la orientación adecuada, en el vector pIRES2-AcGFP1 linealizado con SacI, obteniéndose el plásmido pIRES2-AcGFP1-Mucin-5AC-280 (SEQ ID NO:4). La secuencia en torno a los puntos de inserción en las dianas SacI se verificó mediante secuenciación con los cebadores:

MAO151 5´-GTAGGCGTGTACGGTGGGAGG-3´ (SEQ ID NO:5).

MAO153 5´-CCTTATTCCAAGCGGCTTCGGCC-3´ (SEQ ID NO:6).

El plásmido pIRES2-AcGFP1- Mucin-5AC-280, se obtuvo a partir de un cultivo de un transformante de la cepa DH5 alfa. El DNA fue extraído y purificado utilizando el kit "GenElute™ HP Plasmid Megaprep", de Sigma, y finalmente liofilizado. La Figura 1A muestra un esquema de dicho plásmido.

Se procedió a testar el plásmido obtenido, pIRES2-AcGFP1- Mucin-5AC-280, mediante la transfección de células humanas de epitelio de la córnea (HCE) (Araki-Sasaki *et al*, 1995. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36:614–621) y de la conjuntiva (IOBA-NHC) (Diebold Y *et al*, 2003. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44: 4263–4274) utilizando el plásmido desnudo y asociado a agentes de transfección estándar: Lipectamina™2000 (Invitrogen) y Jet-PEI™-RGD (Polyplus-transfection). Para ello, se sembraron 80.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos y 24 horas después de incubaron con los complejos plásmido (1µg/pocillo) - agente de transfección durante 4 horas, tras lo cual se procedió a añadir medio fresco completo. A las 72 horas de la transfección se estudió la viabilidad celular de los cultivos transfectados mediante el test de toxicidad celular XTT. La eficiencia de transfección se analizó por microscopía de fluorescencia, observando la expresión de la proteína verde fluorescente. La producción de MUC5AC se estudió por ELISA y RT-PCR a tiempo real.

Tanto las células HCE como IOBA-NHC son transfectadas con éxito con el plásmido pIRES2-AcGFP1-Mucin-5AC-280, observándose células con fluorescencia verde, correspondiente a la expresión de GFP.

Se detecta expresión de MUC5AC en células HCE e IOBA-NHC transfectadas, mediante inmunofluorescencia y *Western blotting*. Esta expresión es mayor en células de epitelio corneal que del epitelio conjuntival.

La cantidad de MUC5AC detectada por ELISA en las células HCE transfectadas es un ~2500% mayor que en células sin transfectar. En el caso de las células IOBA-NHC, este porcentaje es del ~1500%.

Los datos de la RT-PCR a tiempo real apoyan los obtenidos a nivel de proteína, con una expresión de MUC5AC del orden de 10.000 veces superior en células transfectadas con JetPei-RGD que en células control, en ambas líneas celulares. En el caso de la lipofectamina, la expresión de MUC5AC fue todavía superior.

Por lo tanto, las células oculares HCE e IOBA-NHC, tras la transfección con del plásmido pIRES2-AcGFP1- MUC5AC-280, son capaces de expresar el plásmido, de sintetizar la proteína transducida (MUC5AC) y de secretarla.

Ejemplo 2. Desarrollo de un plásmido ADN codificador de una mucina.

A partir del plásmido pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280 se desarrolló un plásmido ADN codificador de la mucina MUC5AC, eliminando la región correspondiente a la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. La figura 1B muestra un esquema de dicho plásmido. El procedimiento consistió en la eliminación de la región IRES-GFP de la construcción pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280 mediante digestión y religación. La región eliminada fue la contenida entre el sitio SacI localizado a partir de la base en posición 8370, y el sitio NotI localizado a partir de la posición 9728 de la secuencia de pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280.

La estrategia utilizada fue la descrita a continuación:

1. Digestión parcial con SacI del plásmido pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280 y purificación de la forma lineal del plásmido (13.061 pares de bases)
2. Digestión con NotI y tratamiento con polimerasa de T4 para crear extremos romos. Purificación del fragmento NotI-SacI de 11.706 pares de bases resultante.
3. Ligación, transformación en E. coli DH5 alfa e identificación mediante PCR de colonias de candidatos con la construcción pMUC5AC deseada.
4. Selección de dos clones positivos, extracción de ADN plasmídico y secuenciación para verificar la eliminación de la secuencia IRES-GFP.

Se preparó ADN plasmídico del clon pMUCIN5AC-29 (SEQ ID NO:7), que fue eluído en agua destilada y esterilizada, y digerido por separado con las enzimas SacI y EcoRV, obteniéndose patrones de digestión compatibles con los esperados (corte con SacI: 1 fragmento de 11.702 pares de bases; corte con EcoRV: 3 fragmentos de 6.692 pares de bases, 3.135 pares de bases y 1.875 pares de bases, respectivamente). La fotografía 2 muestra los resultados de digerir 0,5 microlitros la preparación de pMUCIN5AC-29 con estas enzimas (se incluyen controles negativos del plásmido sin digerir).

Ejemplo 3: Preparación de nanopartículas asociando el plásmido pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280 elaboradas a base de gelatina cationizada y de combinaciones con polímeros aniónicos.

Se prepararon nanopartículas de gelatina cationizada según un procedimiento de reticulación iónica en presencia de un polianión. Para ello se procedió previamente a cationizar gelatina del tipo A (MW= 137 kDa) con espermina (SPM), en presencia de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). El punto isoeléctrico final de la gelatina fue de 11,08. Se procedió a la asociación a las nanopartículas del plásmido pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280. Se trata de

una macromolécula cargada negativamente, por lo que se incorporó junto al reticulante aniónico, para evitar la aparición de interacciones previas a la formación de las partículas. El agente reticulante utilizado fue la molécula aniónica tripolifosfato (TPP). Para ello se prepararon disoluciones acuosas en agua mili-Q de gelatina previamente cationizada con espermina (1,0 mg/mL). El agente reticulante se adicionó mediante el empleo de una solución acuosa de TPP (0,125-0,25 mg/mL) en agua mili-Q. Opcionalmente fueron incorporados en la composición los polímeros aniónicos sulfato de dextrano (DS) (0,1 mg/mL) o sulfato de condroitino (CS) (0,125 mg/mL). El correspondiente material genético se incorporó en una concentración de 0,05 µg/µL dando lugar a una relación de masas comprendida entre un 7,3 % y un 9 % con respecto a los constituyentes de las partículas). Para ello, la molécula bioactiva se incorporó a la disolución del reticulante y la disolución resultante se mezcló con la disolución de gelatina cationizada bajo agitación magnética, la cual se mantuvo durante media hora permitiendo la completa evolución del sistema hacia una forma nanoparticular estable. Las formulaciones desarrolladas y sus características físico-químicas (diámetro medio de las nanopartículas obtenidas así como carga eléctrica superficial) se recogen en la Tabla 1.

Composición de la formulación	Relación de componentes	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Asociación (%)
GCspm137:TPP	1:0,125	261,5 ±5,8	0,11	+21,6 ±0,9	99,2±0,5
GCspm137:CS:TPP	1:0,0625:0,625	268,5±28,1	0,12	+33,4 ±3,1	97,6±1,3
GCspm137:DS:TPP	1:0,05:0,625	211,3 ±8,2	0,12	+30,6 ±2,0	95,7±3,2

Tabla 1. Características físico-químicas de las nanopartículas asociando pMUC5AC-280 elaboradas a base de gelatina cationizada con espermina (GCspm137) empleando tripolifosfato sódico (TPP) como agente reticulante y de combinaciones con sulfato de condroitina (CS) o sulfato de dextrano (DS) (n=3).

La asociación del plásmido a las nanopartículas desarrolladas se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. En la figura 3 se puede verificar la morfología esférica y tamaño nanométrico homogéneo de los sistemas formados. Como puede comprobarse en la figura 4, las bandas correspondientes al plásmido incorporado en la elaboración de las nanopartículas no migran en el gel como ocurre con el control de plásmido libre, lo cual indica que se encuentra eficazmente asociado a las nanopartículas.

Ejemplo 4. Los sistemas nanoparticulares asociando plásmido ADN no presentan citotoxicidad significativa en células humanas de córnea y conjuntiva.

La evaluación de la viabilidad de las células en contacto con nanopartículas elaboradas a base de gelatina cationizada y de combinaciones con polímeros aniónicos se llevó a cabo en células humanas de córnea y conjuntiva. Para ello las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos Costar ® (Corning, US) a una confluencia de 10.000 células por pocillo y se dejaron crecer durante 24h antes del ensayo. Las células fueron incubadas durante 4h con 20 µL de formulación (nanopartículas), o bien con 20 µL de disolución de cloruro de benzalconio 1% (control positivo de muerte celular) o con 20 µL de medio de cultivo (control negativo), completando dichos volúmenes con medio DMEM/F-12 hasta un volumen total de 200 µL. Pasado ese tiempo, las células fueron lavadas y se añadió 200 µL del respectivo medio de cultivo. A continuación, las células fueron incubadas con 200 µL de medio RPMI sin rojo fenol con XTT (0,2 mg/mL) durante 15h. Los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad celular relativa al control no tratado. Como se puede apreciar en la figura 5, los sistemas no presentan toxicidad significativa en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

Ejemplo 5. Los sistemas nanoparticulares asociando plásmido ADN son suficientes y necesarios para dar lugar a la producción de mRNA de MUC5AC en células humanas de córnea (HCE) y conjuntiva (IOBA-NHC).

Para los estudios de transfección las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos Costar ® (Corning, US) a una densidad comprendida entre 50.000 y 80.000 células por pocillo y se dejaron crecer durante 24h antes de la transfección. A continuación se incubaron con nanopartículas elaboradas a base de gelatina cationizada y de combinaciones con polímeros aniónicos. Como control positivo se emplearon complejos de JetPEI-RDG (Polyplus-transfections, US) con pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280 (relación 1/10) o con pEGFP (relación 1/5), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron incubadas con los sistemas y los controles (1-5 µg de plásmido por pocillo) durante 4h en medio DMEM/F-12 puro. Se procedió a la cuantificación relativa del ARNm de MUC5AC, de acuerdo con el procedimiento previamente descrito, expresando los resultados en log de mRNA de MUC5AC, normalizados con GAPDH, relativos al control sin transfectar. Como se puede apreciar en la figura 6, en ambas las líneas celulares y con todas las formulaciones ensayadas, fueron detectados niveles significativos de ARNm de MUC5AC, indicando una transfección exitosa.

Ejemplo 6. Los sistemas nanoparticulares asociando plásmido ADN son suficientes y necesarios para dar lugar a la producción por células humanas de córnea y conjuntiva de la mucina MUC5AC.

Para los estudios de transfección las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos Costar ® (Corning, US) a una densidad comprendida entre 50.000 y 80.000 células por pocillo y se dejaron crecer durante 24h antes de la transfección. A continuación se incubaron con nanopartículas elaboradas a base de gelatina cationizada y de combinaciones con polímeros aniónicos. Como control positivo se emplearon complejos de JetPEI-RDG (Polyplus-transfections, US) con pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280 (relación 1/10) o con pEGFP (relación 1/5), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron incubadas con los sistemas y los controles (1-5 µg de plásmido por pocillo) durante 4h en medio DMEM/F-12 puro. La expresión de la MUC5AC a nivel proteico fue evaluada 72h post-transfección. Como se puede apreciar en la figura 7 para ambas líneas celulares se obtuvo una expresión significativa de MUC5AC, confirmando que los sistemas son efectivos para la transfección en células de córnea y conjuntiva.

Ejemplo 7. Los sistemas nanoparticulares asociando plásmido ADN dan lugar a una respuesta biológica capaz de restablecer la funcionalidad en la producción de lágrima en animales con ojo seco inducido, de modo similar al conseguido con formulación comercialmente disponible para esta finalidad.

Se procedió a inducir ojo seco en ratones C57BL/6 mediante la técnica denominada estrés por desecación. Concretamente, los animales fueron tratados con hidrobromuro de escopolamina por vía subcutánea (0,5mg/0,2mL; Sigma-Aldrich, US) tres veces al día alternando las administraciones entre la pata derecha e izquierda y sometidos a un flujo de aire de baja humedad. Para ello, los animales se mantuvieron en jaulas con paredes laterales perforadas para permitir un flujo de aire proporcionado por ventiladores (uno en cada lado de la jaula). Dichas jaulas fueron mantenidas dentro de una campana de flujo (AirClean Systems, US) en la que se mantuvo la humedad del aire por debajo del 40%. La producción de lágrima en los animales se determinó mediante el empleo de un hilo de algodón estéril con indicador de pH rojo de fenol (Zone-Quick, Lacrimedics, US). Para ello, el tiempo de contacto del hilo con el ojo fue de treinta segundos. La distancia de migración de la lágrima fue medida en milímetros, basándose en el cambio de color que dicho hilo experimenta al subir por capilaridad la lágrima. La inducción de ojo seco se inició cinco días antes a la administración de las formulaciones y el procesado de los controles, y se mantuvo durante los cinco días de tratamiento.

Para el tratamiento se administró la formulación F2 (GC137spm:CS:TPP) concentrada 4 veces mediante centrifugación (10.000g, 30 min, 4 ºC, CR22 Beckman Coulter, US) hasta una concentración final de 0,2µg/µL de pMUCIN5AC-29. Las nanopartículas fueron administradas en un volumen de 5µL, 4 veces al día durante 5 días, en cada uno de los ojos, con un intervalo de 1h entre las administraciones (4µg por día de pMUCIN5AC-29; 20µg pMUCIN5AC-29 en total). Una vez administradas las formulaciones se inmovilizó manualmente a los animales durante 1 min.

En el estudio se emplearon cinco grupos de animales control:

- Animales no sometidos a inducción de ojo seco y no tratados.
- Animales con ojo seco inducido y no tratados.
- Animales con ojo seco inducido y tratados con pMUC5AC libre.
- Animales con ojo seco inducido y tratados con nanopartículas blancas (sin plásmido asociado).
- Animales con ojo seco inducido y tratados con formulación comercialmente disponible para el tratamiento del ojo seco (Restasis®, Allergan Inc., USA).

Para la evaluación de la eficacia del tratamiento se determinó la producción de lágrima de acuerdo con el procedimiento previamente descrito, cuantificando los valores basales de producción de lágrima (tiempo cero), los obtenidos tras la inducción de ojo seco (día 5) y los obtenidos al término del tratamiento (día 10). Los resultados se expresaron como promedio ± error estándar de la media de la migración de lágrima en el hilo (mm) de grupos experimentalmente independientes de 4 animales (total de 8 animales). Para el tratamiento estadístico de los resultados se empleó el análisis de variancia de una vía (ANOVA) con medidas repetidas. Las diferencias se consideraron significativas cuando ($p<0,05$).

Tal y como puede apreciarse en la Figura 8, después de la inducción de ojo seco todos los animales presentan disminución en el nivel de producción de lágrima en relación a sus niveles basales ($p<0,05$). La funcionalidad en la producción de lágrima es únicamente restablecida mediante el tratamiento con nanopartículas pMUCIN5AC-29 libre, nanopartículas asociando pMUCIN5AC-29 y con la formulación comercial Restasis ® (emulsión de ciclosporina 0,05%), si bien el restablecimiento es mejor en el caso de las nanopartículas o la formulación comercial.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas poliméricas que comprenden un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada que presenta el extremo N-terminal de MUC5AC unido al dominio de dimerización situado en el extremo C-terminal.

2. Nanopartículas según la reivindicación 1 donde el polinucleótido presenta un 90% de identidad con respecto a SEQ ID NO:2.

3. Nanopartículas según la reivindicación 2 donde el polinucleótido presenta un 95% de identidad con respecto a SEQ ID NO:2.

4. Nanopartículas según la reivindicación 3 donde el polinucleótido presenta un 98% de identidad con respecto a SEQ ID NO:2.

5. Nanopartículas según la reivindicación 4 donde el polinucleótido es SEQ ID NO:2.

6. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicación 1 a 5 donde el polinucleótido se incluye en una construcción genética o un vector.

7. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 formada por al menos:

i) al menos un polímero dotado de carga eléctrica, y

ii) un agente reticulante iónico.

8. Nanopartículas según la reivindicación 7 donde el polímero de (i) es gelatina cationizada.

9. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde el agente reticulante iónico es tripolifosfato.

10. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde además comprende un elemento (iii) el cual es al menos un polímero dotado de carga eléctrica opuesta a la del polímero de (i).

11. Nanopartículas según la reivindicación 10 en la que el polímero del elemento (iii) es sulfato de dextrano o sulfato de condroitino.

12. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde las nanopartículas se encuentran liofilizadas.

13. Uso de nanopartículas según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la elaboración de un medicamento.

14. Uso de nanopartículas según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina.

15. Uso de nanopartículas según la reivindicación 14 donde la mucosa es la mucosa ocular.

16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 donde la deficiencia de mucina es una deficiencia en MUC5AC.

17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 donde la enfermedad se selecciona de la lista que comprende síndrome de insuficiencia límbica, queratitis neurotrófica, queratitis herpética, quemadura por álcalis, quemadura térmica, quemadura por radiación, síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, pénfigos, penfigoide de las membranas mucosas, alergias oculares, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes, atopia, enfermedad injerto-contra huésped, hipofunción glandular salivar, xerostomía o ictiosis.

18. Uso según la reivindicación 17 donde la enfermedad es síndrome de ojo seco.

19. Composición farmacéutica que comprende nanopartículas según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 para su administración vía mucosa ocular, mucosa del tracto gastro-intestinal completo, mucosa de las vías respiratorias, la mucosa urinaria y la mucosa vaginal.

22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, la cual se encuentra en forma liofilizada.

23. Uso de una composición farmacéutica según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 para la elaboración de un medicamento.

24. Uso de una composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de una mucosa que cursa con una deficiencia de mucina.

25. Uso según la reivindicación 24 donde la mucosa es la mucosa ocular.

26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25 donde la deficiencia de mucina es una deficiencia en MUC5AC.

27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 donde la enfermedad se selecciona de la lista que comprende síndrome de insuficiencia límbica, queratitis neurotrófica, queratitis herpética, quemadura por álcalis, quemadura térmica, quemadura por radiación, síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, pénfigos, penfigoide de las membranas mucosas, alergias oculares, queratoconjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis sicca o síndrome de ojo seco, conjuntivitis infecciosas, inmunes e irritativas-tóxico-medicamentosas, Síndrome de Sjögren primario o secundario a otras enfermedades autoinmunes, atopia, enfermedad injerto-contra huésped, hipofunción glandular salivar, xerostomía o ictiosis.

28. Uso según la reivindicación 27 donde la enfermedad es síndrome de ojo seco.

FIG. 1A

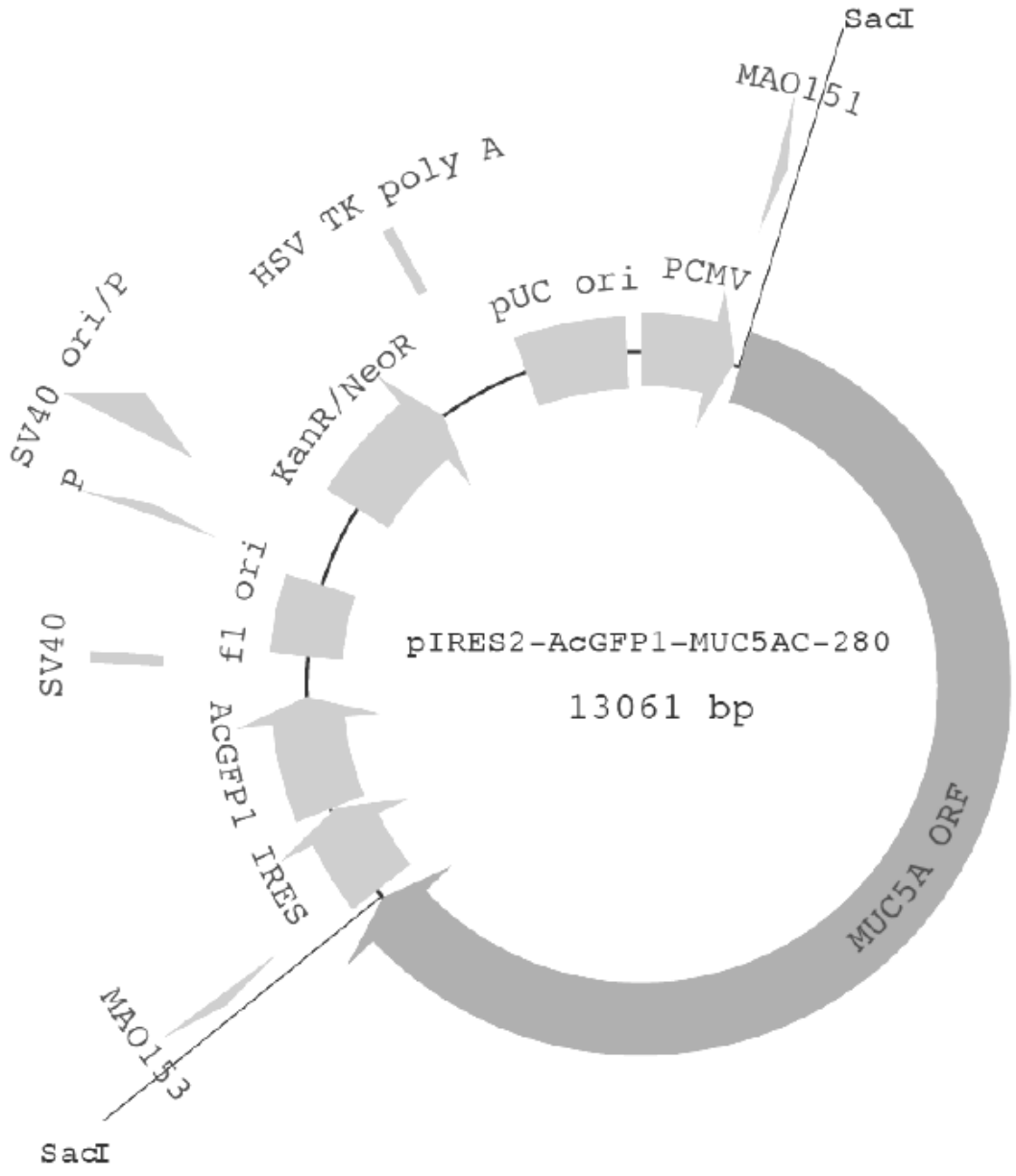

SacI
MAO1 5'
HSV TK poly A
pUC ori
PCMV
SV40 ori/P
KanR/NeoR
P
f1 ori
SV40
pIRES2-AcGFP1-MUC5AC-280
13061 bp
AcGFP1
IRES
MUC5A ORF
MAO1 3'
SacI

FIG. 1B

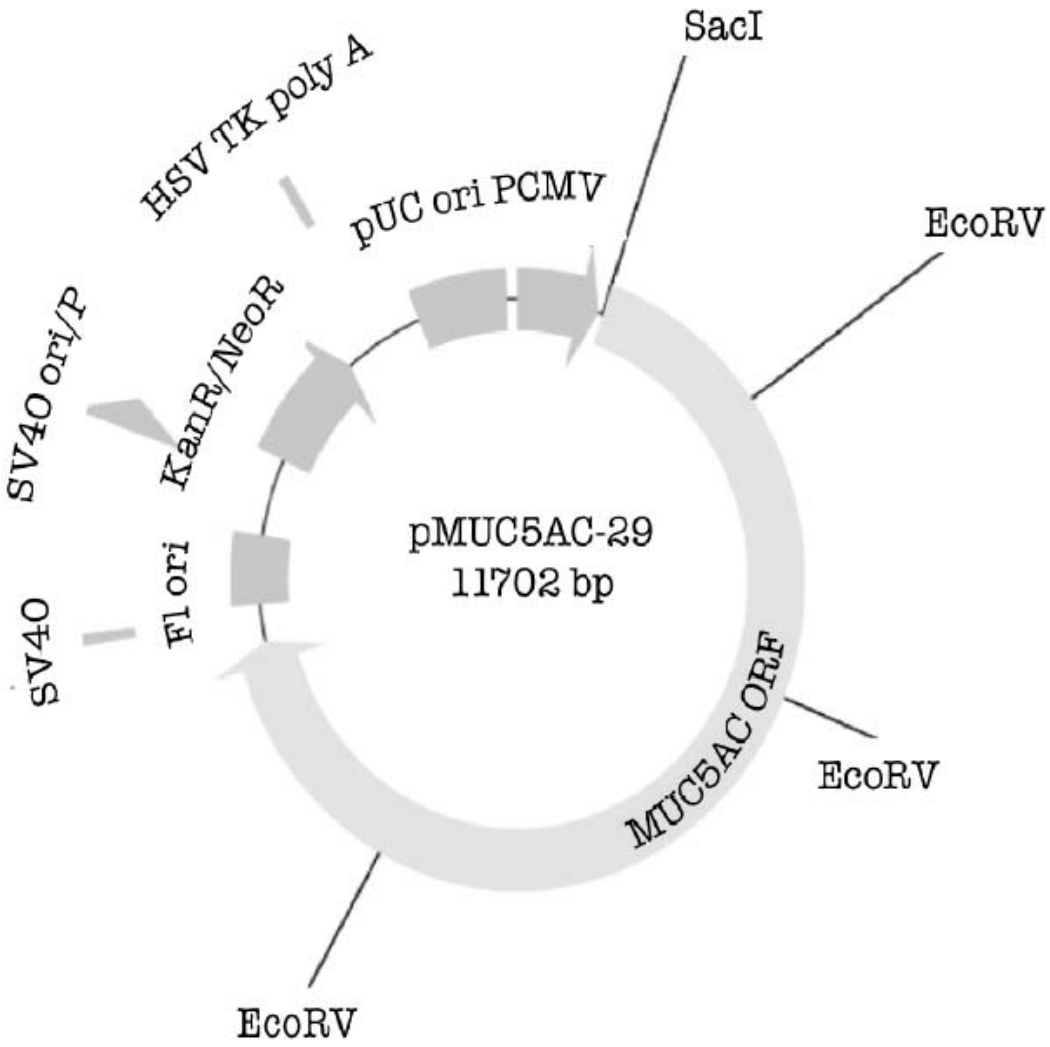

SacI
HSV TK poly A
pUC ori PCMV
EcoRV
SV40 ori/P
KanR/NeoR
pMUC5AC-29
11702 bp
SV40
F1 ori
MUC5AC ORF
EcoRV
EcoRV

FIG. 2

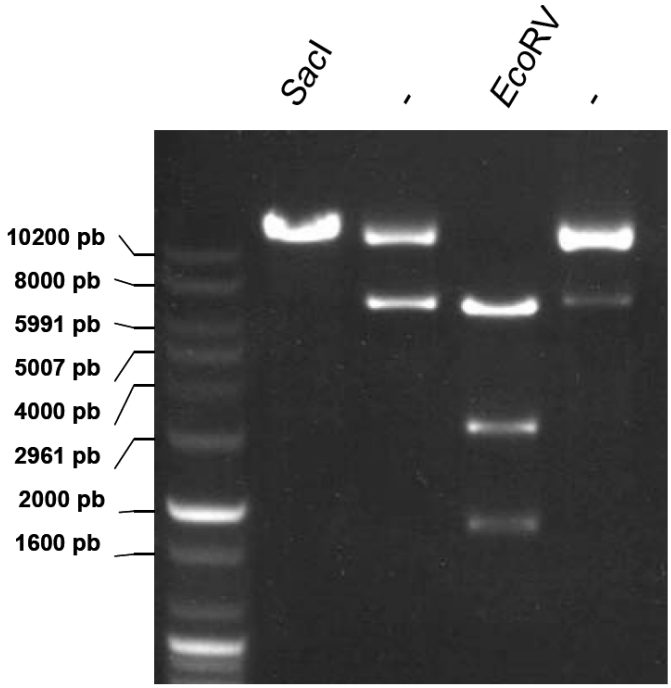

SacI
-
EcoRV
-
10200 pb
8000 pb
5991 pb
5007 pb
4000 pb
2961 pb
2000 pb
1600 pb

FIG. 3

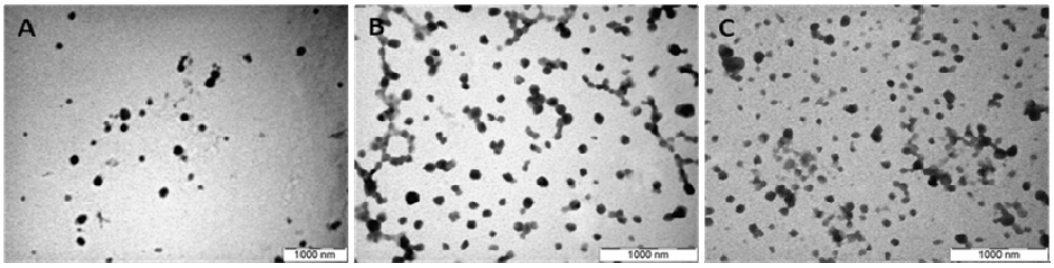

A
B
C
1000 nm
1000 nm
1000 nm

FIG. 4

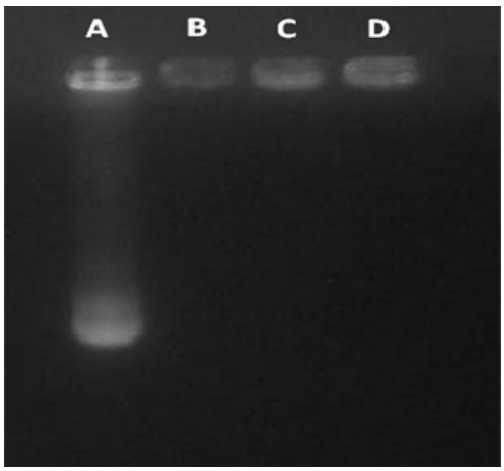

A
B
C
D

FIG. 5A

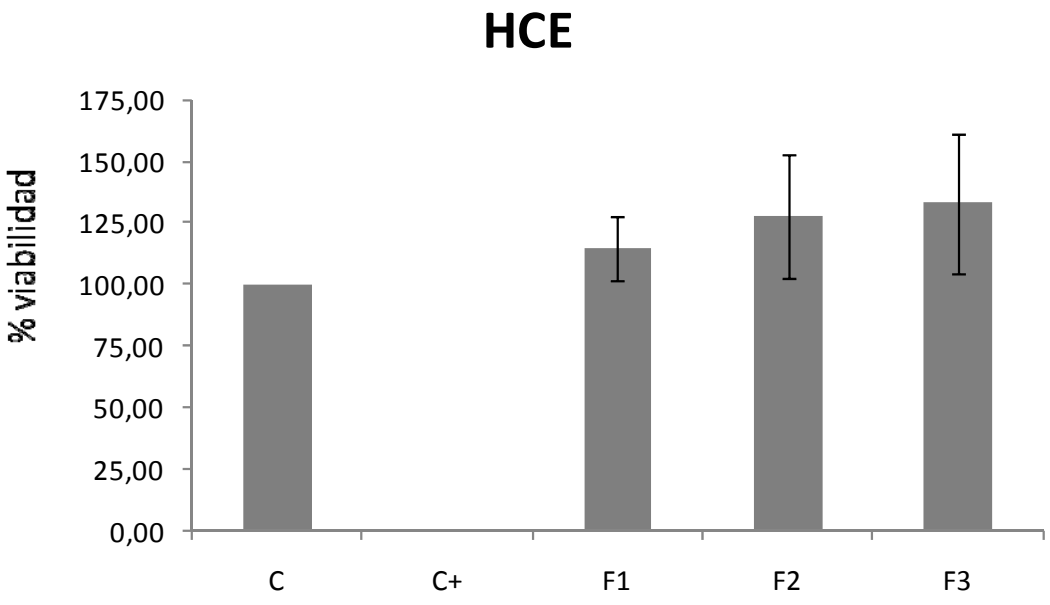

HCE
% viabilidad
175,00
150,00
125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
C
C+
F1
F2
F3

FIG. 5B

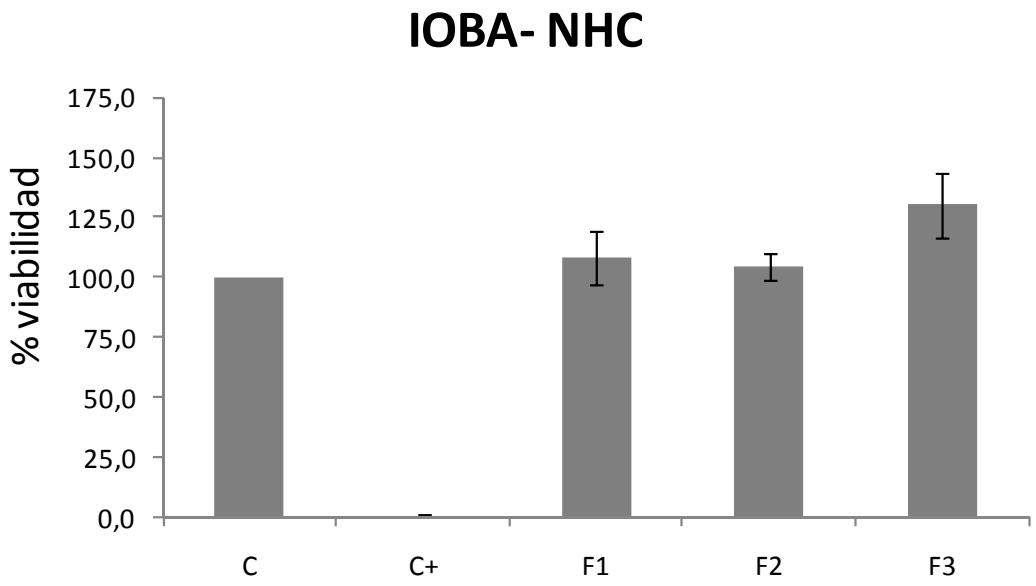

IOBA- NHC
% viabilidad
175,0
150,0
125,0
100,0
75,0
50,0
25,0
0,0
C
C+
F1
F2
F3

FIG. 6A

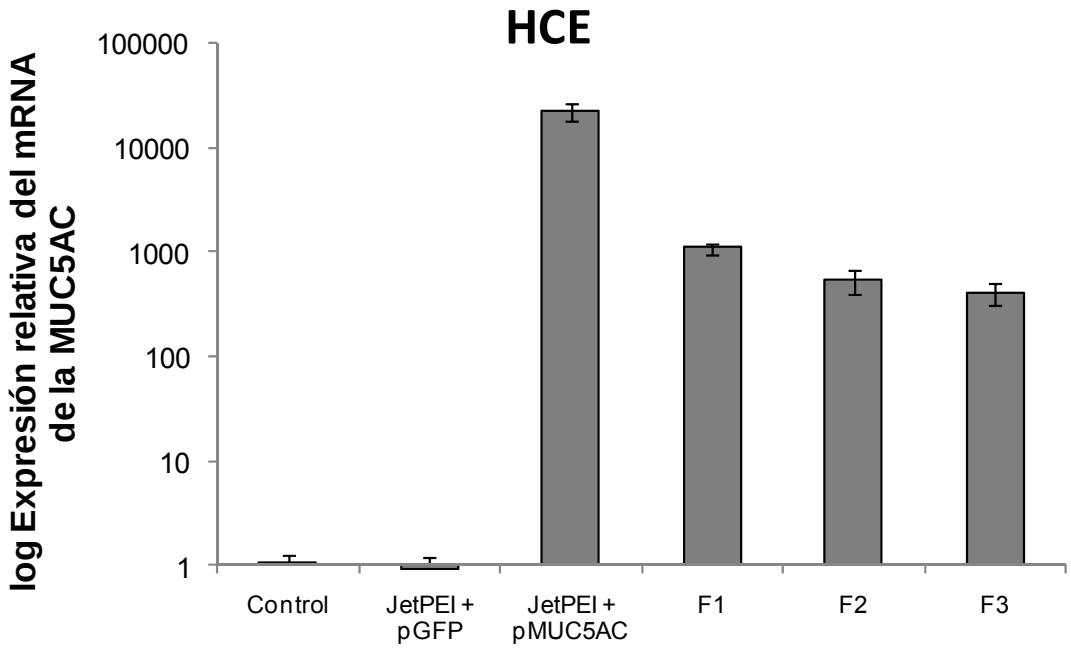

HCE
log Expresión relativa del mRNA de la MUC5AC
100000
10000
1000
100
10
1
Control
JetPEI + pGFP
JetPEI + pMUC5AC
F1
F2
F3

FIG. 6B

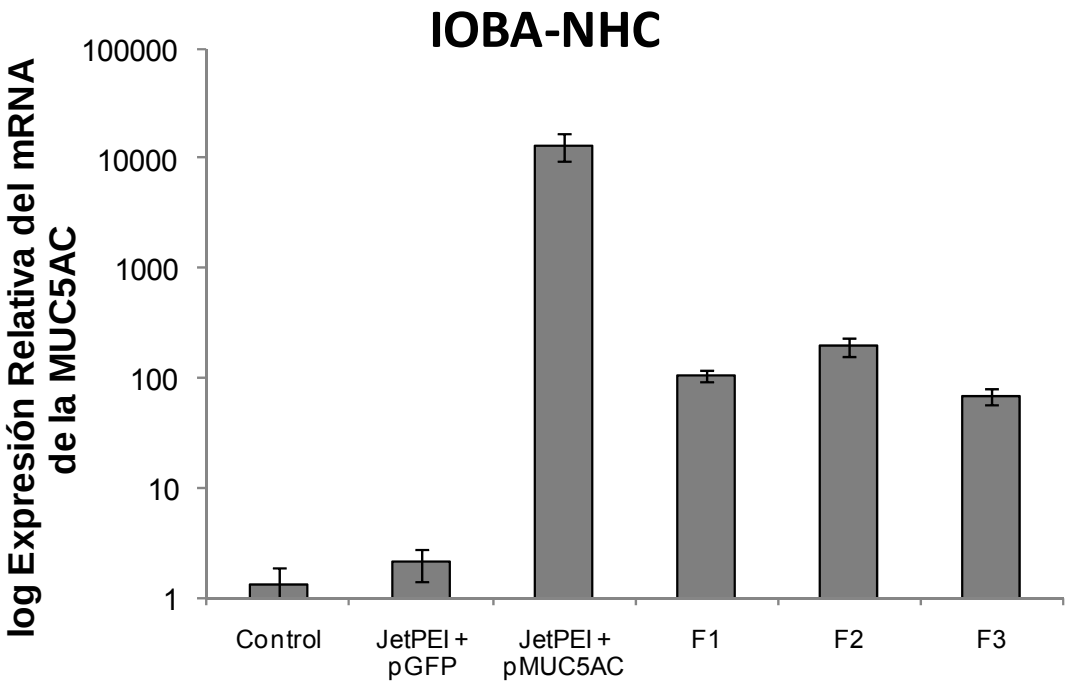

IOBA-NHC
log Expresión Relativa del mRNA de la MUC5AC
100000
10000
1000
100
10
1
Control
JetPEI + pGFP
JetPEI + pMUC5AC
F1
F2
F3

FIG. 7A

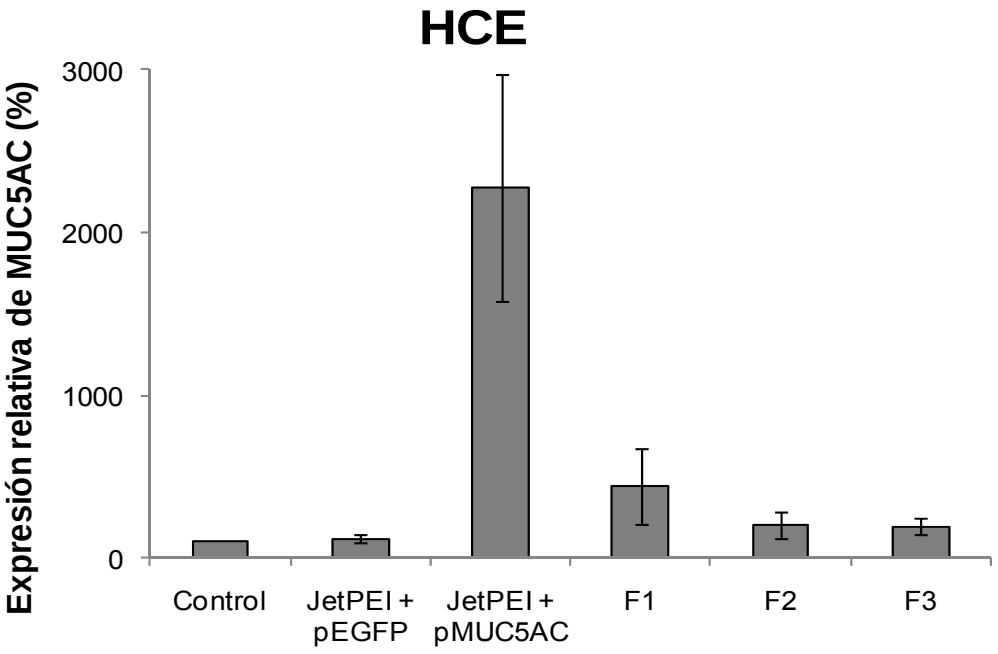

HCE
Expresión relativa de MUC5AC (%)
3000
2000
1000
0
Control
JetPEI + pEGFP
JetPEI + pMUC5AC
F1
F2
F3

FIG. 7B

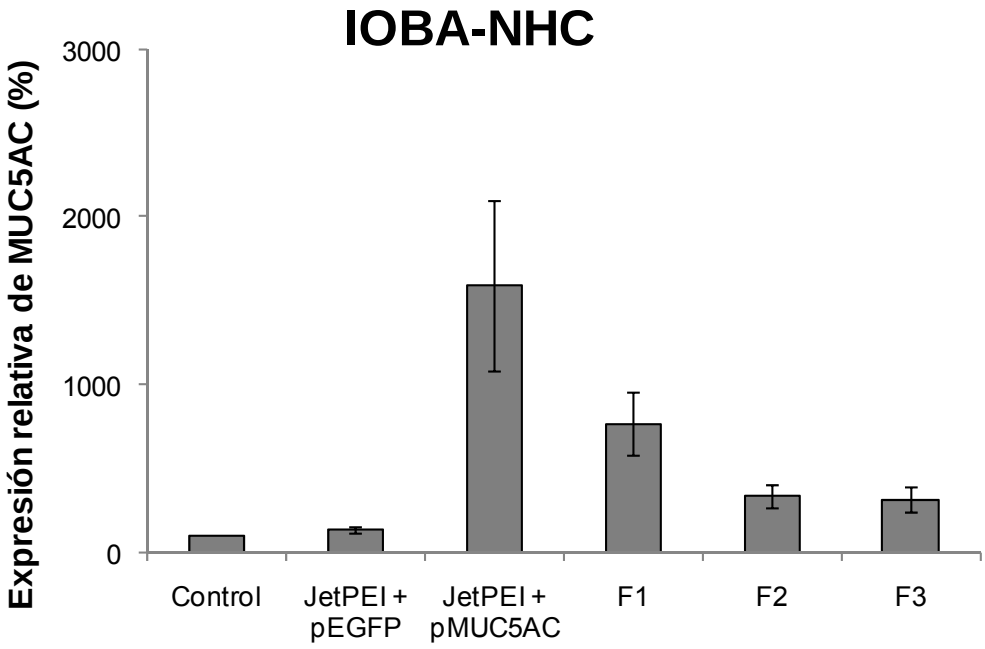
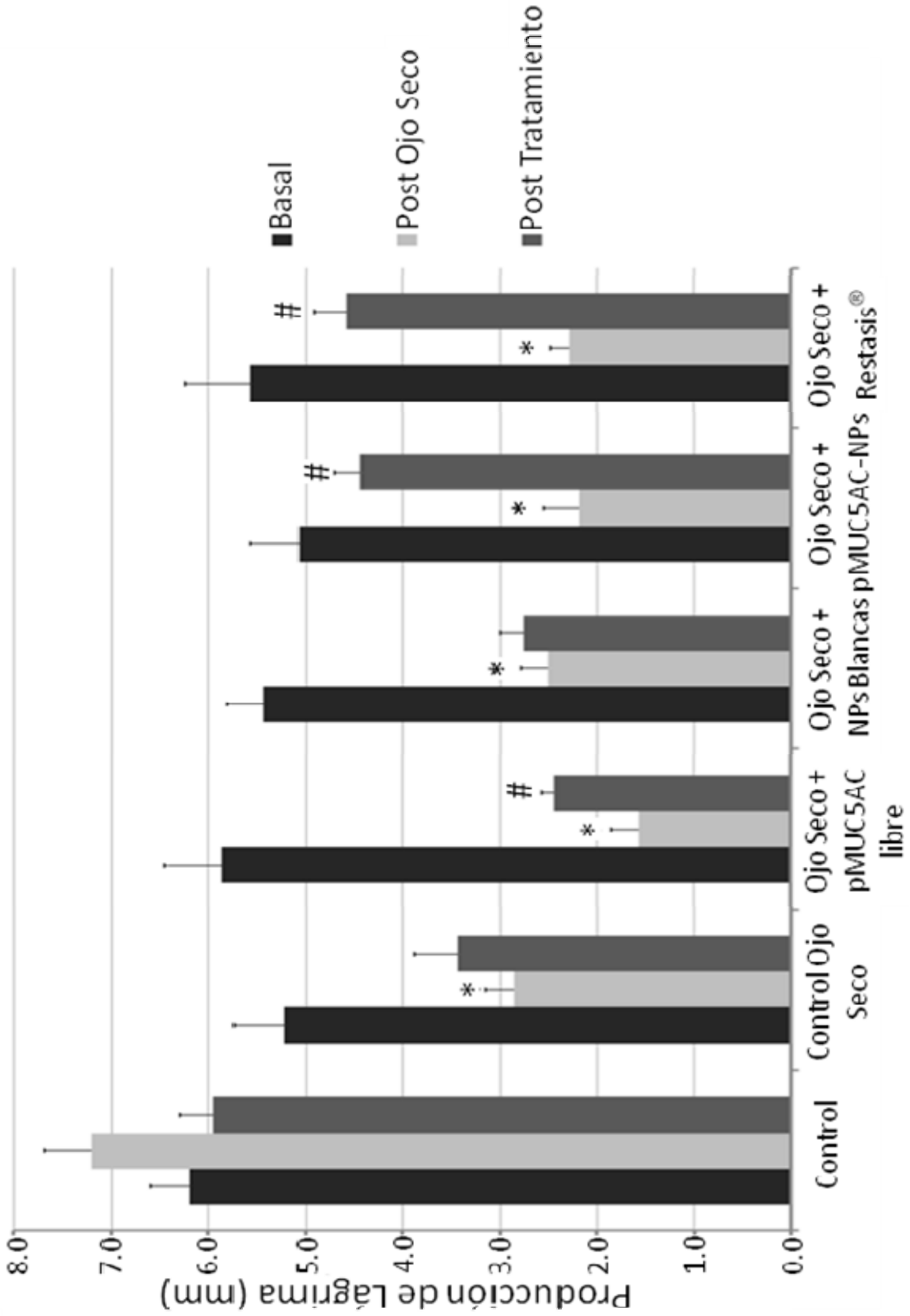

IOBA-NHC
Expresión relativa de MUC5AC (%)
3000
2000
1000
0
Control
JetPEI + pEGFP
JetPEI + pMUC5AC
F1
F2
F3

FIG. 8


Basal
Post Ojo Seco
Post Tratamiento
Producción de Lágrima (mm)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
Control
Control Ojo Seco
Ojo Seco + pMUC5AC libre
Ojo Seco + NPs Blancas
Ojo Seco + pMUC5AC-NPs
Ojo Seco + Restasis®
#
*

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031678

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.11.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
Y	WO 2010/049562 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO) 06.05.2010, todo el documento.	1-4, 6-8, 10-17, 19-27
Y	WO 2004/069136 A2 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS.) 19.08.2004, todo el documento.	1-4, 6-8, 10-17, 19-27
A	KUMARI A. et al. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (08 septiembre 2009); Vol. 75, páginas 1 - 18; DOI: 10.1016/j.colsurf.2009.09.001; ISSN 0927-7765; todo el documento.	1-28
A	ANNICK LUDWIG "The use of mucoadhesivepolymers in ocular drug delivery" AdvancedDrug Delivery Reviews (03 noviembre 2005) Vol.57, N°. 11, páginas 1595 - 1639; DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.005;ISSN 0169-409X; todo el documento.	1-28

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	**Examinador**	**Página**
08.05.2012	M. d. García Coca	1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B82Y5/00 (2011.01)
A61K9/51 (2006.01)
A61K48/00 (2006.01)
A61P27/02 (2006.01)
A61K47/36 (2006.01)
A61K47/22 (2006.01)

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

A61K, A61P

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, XPESP, BIOSIS, EMBL, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.05.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-28	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	5, 9, 18 y 28	**SI**
	Reivindicaciones	1-4, 6-8, 10-17 y 19-27	**NO**

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	WO 2010/049562 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO)	06.05.2010
D02	WO 2004/069136 A2 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS.)	19.08.2004

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-28, son nanopartículas poliméricas que comprenden un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada. Las nanopartículas están formadas por gelatina cationizada, tripolifosfato y sulfato de dextrano o sulfato de condroitino, y se presentan en forma liofilizada (reiv. 1-12). Es también objeto de la invención el uso de las nanopartículas para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad de la mucosa ocular (síndrome de ojo seco) (reiv. 13-18); una composición farmacéutica que comprende dichas nanopartículas (reiv. 19-22) y el uso de dicha composición (reiv. 23-28).

1. Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes)

En el documento D02 se divulga una secuencia (SEQ ID NO: 6) que presenta un 98.5% de identidad con la SEQ ID NO: 2 de la solicitud internacional, sin embargo, la SEQ ID NO: 2 como tal, no se ha encontrado en el estado de la técnica.

El documento D01 divulga nanopartículas formadas por un ingrediente activo (polinucleótido, entre otros), un polímero aniónico, un agente reticulante aniónico y un polímero catiónico. Aunque el polímero aniónico (sulfato de condroitina, sulfato de dextrano) y el polímero catiónico (gelatina cationizada) son los mismos que los polímeros reivindicados en la solicitud internacional, el agente reticulante es distinto. En el caso del divulgado en el documento D01 se trata de la espermina, que es un agente reticulante catiónico, mientras que el reivindicado en la solicitud internacional es el tripolifosfato.

En el documento D02 se divulgan péptidos modificados de mucinas, útiles para el diagnóstico o el tratamiento de distintas enfermedades que están relacionadas con una deficiencia de mucinas, como la conjuntivitis alérgica. Sin embargo no divulga el caso concreto del síndrome del ojo seco.

Por lo tanto, aunque en los documentos del estado de la técnica citados, se divulga parte del objeto de la invención recogida en la solicitud internacional, en estos documentos no hay evidencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 5, 9, 18 y 28. En consecuencia, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 5, 9, 18 y 28, cumple con el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, e implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.

2. Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. Este documento divulga nanopartículas en forma liofilizada, para la administración de ingredientes activos (como polinucleótidos, vectores) que comprenden un polímero aniónico (sulfato de dextrano, sulfato de condroitina), un agente reticulante catiónico (espermina) y un polímero catiónico (gelatina cationizada), donde los componentes de dichas nanopartículas se encuentran entrecruzados mediante interacciones de tipo electrostático. Este documento también divulga el uso de dichas nanopartículas para la elaboración de un medicamento para terapia génica y con fines diagnósticos, y una composición farmacéutica que contiene dichas nanopartículas para su administración por vía oral, ocular, nasal y vaginal entre otras.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-4, 6-8, 10-17, 19-27, es que el ingrediente activo presente en las nanopartículas es un polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada, que es útil en el tratamiento de enfermedades de mucosa ocular que cursan con deficiencias en mucinas, concretamente con deficiencia en MUC5AC.

Sin embargo, en el documento D02 se divulga una secuencia (SEQ ID NO: 6) que presenta un 98.5% de identidad con la SEQ ID NO: 2 de la solicitud internacional. Este documento divulga péptidos modificados de mucinas, útiles para el diagnóstico o el tratamiento de distintas enfermedades, como la conjuntivitis alérgica. Tanto los péptidos, como los polinucleótidos o los compuestos divulgados, son útiles en la terapia o prevención de dichas enfermedades, que están relacionadas con una deficiencia de mucinas.

Por lo tanto, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, resulta obvio para un experto en la materia preparar nanopartículas poliméricas donde sus componentes se encuentren entrecruzados mediante interacciones de tipo electrostático, tal y como se divulga en el documento D01, que comprendan el polinucleótido que codifica para una proteína MUC5AC modificada, para elaborar un medicamento para tratar enfermedades de mucosa ocular que cursan con deficiencias en mucinas (concretamente con deficiencia en MUC5AC), tal y como se divulga en el documento D02. En consecuencia, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-4, 6-8, 10-17, 19-27, de la solicitud, aunque es nueva en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.