(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 738 173**

(21) Número de solicitud: 201830729

(51) Int. CI.:

A61K 9/51 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

19.07.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.01.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

29.06.2020

Fecha de concesión:

26.11.2020

(45) Fecha de publicación de la concesión:

03.12.2020

(73) Titular/es:

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES

(72) Inventor/es:

ALONSO FERNANDEZ, Maria Jose y
DURAN LOBATO, Matilde

(74) Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

(54) Título: **NANOSISTEMAS CON COMPLEJOS**

(57) Resumen:
Nanosistemas con complejos. La presente invención se refiere a un nanosistema caracterizado por un complejo y una cubierta, a los procedimientos de obtención, a complejos y sus usos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Nanosistemas con complejos

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un nanosistema caracterizado por un complejo y una cubierta, a los procedimientos de obtención, a complejos y sus usos.

Antecedentes de la invención

La administración de moléculas biológicas es uno de los retos en formulación farmacéutica debido a la labilidad, incapacidad para atravesar o interaccionar con barreras biológicas y/o solubilidad inadecuada de dichas moléculas activas. Algunas de las soluciones que se han venido presentando en la técnica están basadas en la nanotecnología.

Existen antecedentes bibliográficos que muestran que nanosistemas formados por lípidos y polímeros son capaces de liberar insulina, pero frecuentemente no lo hacen de un modo controlado sino que el perfil de liberación muestra un fuerte *burst* inicial (Santalices, I., Gonella, A., Torres, D., & Alonso, M. J., Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017, 42, 115-180; Müller, R. H., MaÈder, K., & Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery–a review of the state of the art, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000, 50(1), 161-177).

Así, todavía es necesario aportar nanosistemas que sean capaces de proteger dichas moléculas activas tras su exposición a un medio biológico y facilitar su transporte a través de barreras biológicas, bien sean barreras mucosas, epiteliales o celulares. Y además, que controlen realmente la liberación de las sustancias activas, como por ejemplo insulina, evitando el *burst* inicial.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un nanosistema capaz de proteger moléculas biológicas de la degradación que sufren en fluidos biológicos. Pero además, los nanosistemas de la invención son capaces de proteger a dichas moléculas biológicas también

frente a degradaciones en el cuerpo animal como es la degradación pancreática, permitiendo de este modo la permanencia durante un tiempo más prolongado en ese lugar de acción.

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un nanosistema caracterizado por:

(i) un complejo que comprende a) un poliaminoácido o un polinucleótido caracterizado por tener carga negativa y b) un metal, y

(ii) una cubierta que comprende al menos una molécula con carga,

con la condición de que la carga neta del complejo (i) es opuesta a la carga de la molécula de la cubierta.

Un segundo aspecto se dirige a un procedimiento para la obtención del nanosistema del primer aspecto de la invención, que comprende añadir una disolución de al menos una molécula ionizable o con carga, a un complejo que comprende a) un poliaminoácido o un polinucleótido caracterizado por tener carga negativa, y b) un metal,

con la condición de que la carga neta del complejo es opuesta a la carga de la molécula ionizable o con carga.

En una realización particular, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación del complejo descrito anteriormente, que comprende:

a) mezclar un poliaminoácido o un polinucleótido y un metal,

b) cuando en la etapa a) se mezcla un poliaminoácido, entonces modificar el pH de la mezcla para alcanzar un pH igual o superior al del punto isoeléctrico del poliaminoácido,

c) incubar la mezcla a una temperatura entre 0 y 8ºC, y

d) dispersar la mezcla en un medio tamponado.

En un tercer aspecto la invención se dirige al complejo obtenible mediante el procedimiento descrito en las etapas a) a d). En otro aspecto la invención se dirige a un complejo que comprende una proteína y un metal de transición y tiene un tamaño medio inferior a 200 nm. En otro aspecto la invención se dirige a un complejo que consiste en insulina y zinc y que tiene un tamaño medio inferior a 120 nm.

En un cuarto aspecto la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un nanosistema o un complejo como se han descrito en la presente invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un quinto aspecto la invención se dirige a un nanosistema o a una composición farmacéutica como se han descrito en la presente invención, para su uso en medicina. En una realización particular, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas a desórdenes hormonales, metabólicos o inmunológicos, procesos inflamatorios, enfermedades degenerativas y tumores. Más en particular, para su uso en el tratamiento de diabetes. Más en particular, para la administración por vía oral.

Descripción de las figuras

Figura 1. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanocomplejos de Insulina-Zn, revelando una morfología cúbica u ortoédrica.

Figura 2. Cambio en ZP desde valores negativos a neutros a media que se incrementa la concentración de agentes de recubrimiento: 2A: recubiertos por LAE y PEG st; 2B: recubiertos por CTAB y PEG st.

Figura 3. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanocomplejos de Insulina-Zn recubiertos preparados en el ejemplo 4, revelando una morfología cúbica u ortoédrica.

Figura 4. Caracterización del sistema por RMN: 4A: representación esquemática del planteamiento de la estructura de la cubierta de LAE y PEG st ; 4B: espectro de ^{1}H-RMN de los nanocomplejos no recubiertos; 4C: espectro de ^{1}H-RMN de PEG st; 4D: espectro de ^{1}H-RMN de LAE; 4E: espectro de ^{1}H-RMN de los nanocomplejos recubiertos con LAE y PEG st; 4F: espectro DOSY de los nanocomplejos recubiertos; 4G: espectro waterLOGSY de los nanocomplejos recubiertos.

Figura 5. Estabilidad coloidal de nanocomplejos Insulina-Zn sin y con recubrimiento en SIF: 5A: nanocomplejos no recubiertos; 5B: recubiertos por LAE y PEG st; 5C: recubiertos por CTAB y PEG st.

Figura 6. Liberación de insulina en SIF desde: 6A: los nanocomplejos no recubiertos; 6B: los nanocomplejos recubiertos por LAE y PEG st.

Figura 7. Estudio proteolítico de nanocomplejos recubiertos.

Figura 8. Liofilización de nanocomplejos recubiertos con diferentes concentraciones de crioprotector (trehalosa)

Figura 9. Evolución en el tiempo del tamaño y *count rate* de formulaciones liofilizadas y concentradas x4 y x8 veces mantenidas a temperatura ambiente.

Figura 10. Distribución de radioactividad en órganos tras administración de 10A: nanocomplejos marcados con Tecnecio-99m en ratas; 10B: control (Tecnecio-99m libre).

Figura 11. Administración subcutánea (s.c.) en ratas sanas de los nanocomplejos, antes y después de liofilizar, comparado con una solución de insulina.

Figura 12. Reducción de glucosa tras administración intrajejunal (i.j.) en ratas sanas.

Figura 13. Reducción de glucosa tras administración intrajejunal (i.j.) en ratas diabéticas.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la invención han diseñado unos nanosistemas caracterizados por:

(i) un complejo que comprende a) un poliaminoácido o un polinucleótido caracterizado por tener carga negativa y b) un metal, y

(ii) una cubierta que comprende al menos una molécula con carga,

con la condición de que la carga neta del complejo (i) es opuesta a la carga de la molécula de la cubierta.

Los complejos en los nanosistemas de la invención presentan una carga neta dependiente de los componentes que lo forman, y así, la carga neta puede variar según la proporción en la que se encuentren dichos componentes. Un experto en la materia conoce métodos para medir la carga neta del complejo. Según la presente invención la carga neta del complejo es el valor de potencial Zeta medido mediante anemometría Láser Doppler. Una descripción particular de cómo medir dicho potencial Zeta se encuentra en el ejemplo 1 del presente documento.

En una realización particular, el metal tiene una valencia igual o mayor a +2, o dicho de otro modo, se encuentra en un estado de oxidación igual o superior a +2. En una realización más particular, el estado de oxidación en el que se encuentra el metal es +2 o +3. En otra realización particular, el metal se selecciona de entre zinc, hierro, calcio, magnesio, cobre, cromo,

manganeso, níquel, rutenio, bario, estroncio, bismuto, platino, zirconio, germanio, titanio, molibdeno, cobalto y estaño.

En una realización particular el poliaminoácido se selecciona de entre un péptido, una proteína y un anticuerpo monoclonal.

En una realización particular, los péptidos de la invención comprenden dos o más aminoácidos.

En una realización particular, los péptidos y proteínas de la invención se seleccionan de entre hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores hematopoyéticos, enzimas, receptores, proteínas antigénicas, factores de coagulación, moléculas de adhesión y receptores celulares. En una realización más particular, los poliaminoácidos de la invención se seleccionan de entre insulina, proteínas GLP-1, proteínas GLP-2, somatropina, anakinra, dornasa alfa, proteínas séricas, proteínas SPARC u osteonectina, proteína C, subfamilia A de queratina, hormona de crecimiento humano o somatotropina, gonadotropina, angiopoyetina, factores estimulantes de colonias, factor de crecimiento epidérmico, eritropoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos, familia de ligandos de GDNF, factor de diferenciación de crecimiento 9, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factores de crecimiento tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor estimulante de migración, proteína estimulante de macrófagos, neurotrofinas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento derivado de plaquetas, trombopoyetina, factores de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial vascular, quimioquinas, interferones, interleucinas, linfoquinas, factores de necrosis tumoral, proteínas de fusión Fc, péptidos y derivados de contulaquina-G, antifilamina, péptidos opioides, lipopéptidos y antígenos.

En una realización más particular, las proteínas GLP-1 comprenden exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida, taspoglutida y semaglutida. En una realización más particular, las proteínas GLP-2 comprenden teduglutida. En una realización más particular, los factores estimulantes de colonias comprenden factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos y factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos. En una realización más particular, los interferones comprenden interferón alfa IIb, interferón alfacon-1 e interferón alfa-n3. En una realización más particular, los factores de necrosis tumoral comprenden factor de necrosis tumoral alfa. En una realización más particular,

los lipopéptidos comprenden surotomicina. En una realización más particular, los antígenos comprenden toxoides de tétanos, toxoides de difteria, hepatitis B.

En una realización particular, los anticuerpos monoclonales de la invención se seleccionan de entre elotuzumab, panitumumab, trastuzumab, bevacizumab, adalimumab, ritusimumab y anticuerpos anti-TNF.

Para que se forme el complejo es necesario que el poliaminoácido tenga una carga neta opuesta a la carga del metal, es decir, carga negativa. Para ello, el poliaminoácido puede ser ionizado y que la carga neta resultante sea negativa, o bien que el poliaminoácido posea un grupo funcional con carga negativa. La carga neta del poliaminoácido podrá ser positiva o negativa dependiendo del pH del medio. Cuando el poliaminoácido, y en particular el péptido, la proteína o el anticuerpo monoclonal, se encuentra en un medio con un pH superior al punto isoeléctrico entonces estará ionizado negativamente.

En una realización particular, los polinucleótidos se seleccionan de entre ARN transferente, ARN interferente, ARN de silenciamiento, ADN, oligonucleótidos antisentido, micro-ARN y ARN bicatenario.

Para que se forme el complejo entre el metal y el polinucleótido, el polinucleótido debe tener una carga neta negativa. La carga neta de un polinucleótido depende de los nucleótidos que lo forman y un experto en la materia conoce que la carga neta del polinucleótido es negativa.

En una realización particular, el complejo comprende insulina y zinc. En otra realización particular, el complejo comprende hierro y tRNA.

La cubierta de los nanosistemas de la invención comprende al menos una molécula con carga.

En una realización particular, la molécula con carga de la cubierta se selecciona entre moléculas que tienen al menos un grupo funcional seleccionado de entre guanidino, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amina cuaternaria y tiol,

En una realización particular, la molécula con carga de la cubierta se selecciona entre moléculas que tienen al menos un grupo funcional seleccionado de entre carboxilato, fosfato, nitrato, carbonato y sulfato.

En una realización particular, la molécula con carga de la cubierta se selecciona de entre tensioactivos ionizables o con un grupo funcional con carga, polímeros ionizables o con un grupo funcional con carga, polisacáridos ionizables, poliaminoácidos, homo y co-polímeros conteniendo residuos ionizables, aminas cuaternarias, y combinaciones de los mismos. En una realización más particular, la molécula con carga de la cubierta se selecciona de entre etil lauroil arginato, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, cloruro de benzetonio, ácido hialurónico, quitosano, quitosano-polietilenglicol, poliarginina, poliarginina-polietilenglicol, polihistidina, polihistidina-polietilenglicol, protamina, sulfato de condroitino, ácido poliglutámico, ácido puliglutámico-polietilenglicol, ácido poliaspártico, ácido poliaspártico-polietilenglicol, ácido polisiálico, sulfato de heparán, sulfato de queratán, y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, la cubierta puede comprender además moléculas no ionizables y sin carga, es decir, moléculas neutras. En una realización más particular, las moléculas no ionizables y sin carga se seleccionan de entre tensioactivos no iónicos, polímeros sin carga, polialcoholes, y sus combinaciones. En una realización más particular, la molécula neutra de la cubierta se selecciona del grupo consistente en ésteres de ácidos grasos, ésteres de polietilenglicol, monoésteres de sucrosa, sorbitanos, polisorbatos, poloxámeros, polietilenglicol, polipropilenglicol, polivinilalcohol, y sus combinaciones. En una realización más particular, la molécula neutra es polietilenglicol estearato 40.

La interacción entre el complejo y la cubierta se basa en una interacción electrostática, de modo que la molécula presente en la cubierta podrá ser ionizable y así tener un ión con una carga opuesta a la carga del complejo. Alternativamente, la molécula presente en la cubierta puede tener un grupo funcional con una carga opuesta a la carga del complejo. Y la carga neta de la molécula de la cubierta será la opuesta a la del complejo.

Un experto en la materia puede medir la carga del complejo como se ha explicado anteriormente, y seleccionar entonces la molécula de la cubierta. Además, podrá incorporar moléculas neutras o sin carga ya que no varían la carga neta total de la cubierta. La incorporación de moléculas neutras a la cubierta permite aumentar la estabilidad de los nanosistemas.

Por ejemplo, cuando el complejo tiene una carga neta negativa, el experto en la materia seleccionará una molécula con carga positiva para la cubierta como por ejemplo etil lauroil arginato, bromuro de cetiltrimetilamonio o bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Y podrá además incorporar moléculas neutras como por ejemplo estearato de polietilenglicol. Por ejemplo, cuando el complejo tiene una carga neta positiva, el experto en la materia seleccionará una molécula con carga negativa para la cubierta, como por ejemplo, ácido hialurónico que es posible ionizarlo en medio básico como resulta evidente para un experto en la materia.

Una ventaja adicional de la cubierta es que confiere estabilidad al nanosistema, incluso cuando el nanosistema se encuentra en fluidos biológicos *in vitro*. Así, se demuestra en el ejemplo 5 de la presente invención que el nanosistema recubierto es estable en Fluido Intestinal Simulado, propiedad que no presenta el sistema sin cubierta (ejemplo 5).

Otra ventaja adicional de los nanosistemas de la invención frente a los complejos sin recubrimiento, es que permiten liberar de forma muy controlada poliaminoácidos o polinucleótidos, evitando un *burst* inicial y manteniendo la liberación a lo largo del tiempo, al menos durante 4 horas. Estas características los hacen especialmente adecuados para la administración de poliaminoácidos y polinucleótidos por vía oral, de forma preferida insulina.

Los nanosistemas de la presente invención presentan un diámetro medio inferior a 1 μm, es decir, tienen un tamaño de entre 1 y 999 nm, preferiblemente inferior a 200 nm, más preferiblemente inferior a 170 nm, aún más preferiblemente inferior a 120nm. El tamaño de los nanosistemas está influido principalmente por la composición y las condiciones de preparación y puede medirse mediante dispersión de luz dinámica (DLS), como se muestra en los ejemplos. El tamaño de los nanosistemas no varía de forma significativa cuando se liofilizan o cuando se mantienen liofilizados a lo largo del tiempo, o cuando se reconstituyen después de haber sido liofilizados, como se demuestra en el ejemplo 6, obteniéndose en todos los casos sistemas de tamaño nanométrico.

Los nanosistemas de la invención presentan un índice de polidispersión (PDI) bajo que puede medirse mediante dispersión de luz dinámica (DLS). En una realización particular, el índice de polidispersión de los nanosistemas es preferiblemente inferior a 0,5, más preferiblemente inferior a 0,4. Esto indica que forman una población homogénea de nanopartículas en la cuál es esperable un comportamiento similar y controlado de cada uno de los nanosistemas que la conforman.

La carga de los nanosistemas de la invención puede ser neutra, positiva o negativa. De forma preferida la carga de los nanosistemas de la invención es neutra. En una realización particular los nanosistemas de la invención tienen una carga aproximadamente neutra. En una realización particular, los nanosistemas de la invención tienen una carga entre -5,0 mV y + 5,0 mV. En una realización preferida los nanosistemas de la invención tienen una carga entre -1,0 mV y +1,0 mV.

En otra realización particular, los nanosistemas de la invención tienen una carga positiva inferior a +50mV, preferiblemente inferior a +30 mV. En una realización particular, los nanosistemas de la invención tiene una carga entre +0,1 mV y +30 mV.

Un experto en la materia conoce métodos para poder medir la carga del nanosistema. Según la presente invención la carga del nanosistema es el valor de potencial Zeta medido mediante anemometría Láser Doppler. Una descripción particular de cómo medir dicho potencial Zeta se encuentra en los ejemplos.

En una realización particular, los nanosistemas de la invención tienen una carga positiva inferior a +30mV y un índice de polidispersión inferior a 0,5.

En una realización particular, un nanosistema de la invención consiste en insulina, zinc, estearato de polietilenglicol y etil lauroil arginato y tiene un tamaño medio inferior a 120 nm. En una realización particular, un nanosistema de la invención consiste en insulina, zinc, estearato de polietilenglicol y etil lauroil arginato y tiene un tamaño medio inferior a 120 nm y un índice de polidispersión inferior a 0.5.

En otra realización particular, un nanosistema de la invención consiste en insulina, zinc, estearato de polietilenglicol y bromuro de cetiltrimetilamonio y tiene un tamaño medio inferior a 120 nm.

Además, es destacable que tanto los complejos como los nanosistemas de la invención tienen forma cubica u ortoédrica con esquinas o vértices perfectamente definidas como se observa en las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (ver figura 3.

La morfología de los nanosistemas de la invención podría tener una influencia ventajosa a la hora de administrar poliaminoácidos o polinucleóticos por vía oral a mucosas, mejorando la capacidad de internalización, retención en el tracto gastrointestinal y transporte *in vivo* vía oral.

Así, en una realización particular, los nanosistemas de la invención se caracterizan además por tener forma cubica u ortoédrica.

En otro aspecto la invención se dirige a un procedimiento para la obtención de un nanosistema según se ha descrito anteriormente, que comprende añadir una disolución de al menos una molécula ionizable o con carga, a un complejo que comprende a) un poliaminoácido o un polinucleótido caracterizado por tener carga negativa, y b) un metal,

con la condición de que la carga neta del complejo es opuesta a la carga de la molécula ionizable o con carga.

La molécula ionizable o con carga formará parte de la cubierta. Por ejemplo, la molécula ionizable puede tener un grupo guanidino o amino que son grupos protonables y así tener carga positiva. Por ejemplo, la molécula ionizable puede tener un grupo ácido carboxílico que se puede desprotonar y tener así carga negativa. Por ejemplo, la molécula ionizable o con carga puede tener un grupo amino cuaternario que está cargado positivamente.

En una realización particular, la molécula ionizable o con carga se selecciona entre moléculas que tienen al menos un grupo funcional seleccionado de entre guanidino, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amina cuaternaria y tiol,

En una realización particular, la molécula ionizable o con carga de la cubierta se selecciona entre moléculas que tienen al menos un grupo funcional seleccionado de entre carboxilato, fosfato, nitrato, carbonato y sulfato.

En una realización particular, la molécula ionizable o con carga de la cubierta se selecciona de entre tensioactivos ionizables o con un grupo funcional con carga, polímeros ionizables o con un grupo funcional con carga, polisacáridos ionizables, poliaminoácidos, homo y co-polímeros conteniendo residuos ionizables, aminas cuaternarias, y combinaciones de los mismos. En una realización más particular, la molécula con carga de la cubierta se selecciona de entre etil lauroil arginato, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, cloruro de benzetonio, ácido hialurónico, quitosano, quitosano-polietilenglicol, poliarginina, poliarginina-polietilenglicol, polihistidina, polihistidina-polietilenglicol, protamina, sulfato de condroitino, ácido poliglutámico, ácido puliglutámico-polietilenglicol, ácido poliaspártico, ácido

poliaspártico-polietilenglicol, ácido polisiálico, sulfato de heparán, sulfato de queratán, y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, el procedimiento puede comprender además añadir moléculas no ionizables y sin carga, es decir, moléculas neutras. En una realización más particular, las moléculas no ionizables y sin carga se seleccionan de entre tensioactivos no iónicos, polímeros sin carga, polialcoholes, y sus combinaciones. En una realización más particular, la molécula neutra de la cubierta se selecciona del grupo consistente en ésteres de ácidos grasos, ésteres de polietilenglicol, monoésteres de sucrosa, sorbitanos, polisorbatos, poloxámeros, polietilenglicol, polipropilenglicol, polivinilalcohol, y sus combinaciones. En una realización más particular, la molécula neutra es polietilenglicol estearato 40.

En una realización particular, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación del complejo descrito anteriormente, que comprende

a) mezclar un poliaminoácido o un polinucleótido, y un metal,
b) cuando en la etapa a) se mezcla un poliaminoácido, entonces modificar el pH de la mezcla para alcanzar un pH igual o superior al del punto isoeléctrico del poliaminoácido,
c) incubar la mezcla a una temperatura entre 0 y 8ºC,
d) dispersar la mezcla en un medio tamponado.

Así, un experto en la materia podrá modificar el pH del medio en el que prepara el complejo para alcanzar o superar el punto isoeléctrico del poliaminoácido de interés o bien añadir el poliaminoácido ya ionizado al medio. En una realización particular, el pH se ajusta entre 4,0 y 6,0.

Los complejos se pueden preparar de un modo alternativo que comprende mezclar de forma gradual una solución de un poliaminoácido o un polinucleótido, y un metal, bajo agitación.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, aunque no son limitativos de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de nanocomplejos de Insulina-Zn.

Los nanocomplejos se obtuvieron mediante un procedimiento de dos pasos, consistente en la inducción de la interacción controlada entre insulina y zinc por medio del ajuste de pH, seguida de la incubación de la mezcla a 4ºC y posterior dispersión del complejo en buffer:

Se preparó una solución de insulina 1.5 mg/mL en HCl 0.005N, a la cual se añadió acetato de zinc 20 mg/mL en agua ultrapura de acuerdo con un ratio molar insulina:zinc 1:6. A continuación se ajustó el pH de la mezcla a 5,13 mediante la adición de NaOH bajo agitación magnética, tras lo cuál se incubó la mezcla a 4ºC. Tras la incubación, se atemperó la mezcla a temperatura ambiente y seguidamente se resuspendió el sedimento obtenido en las etapas anteriores mediante vorteo. A continuación, se añadió el sedimento resuspendido sobre PBS 10 mM en relación 1:1 v/v bajo agitación magnética. Finalmente, se dejó equilibrar la suspensión a temperatura ambiente antes de caracterizar.

Propiedades fisicoquímicas de los nanocomplejos

La distribución de tamaños de partícula y el PDI se determinaron por dispersión de luz dinámica (DLS) y los valores de potencial zeta (ZP) se determinaron a partir de los valores de movilidad electroforética por Doppler anemometry (LDA) en un equipo Malvern Zetasizer (NanoZS ZEN 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, UK), equipado con un haz de luz roja láser (λ = 632,8 nm). Las formulaciones se midieron directamente sin diluir a 25ºC, al menos en tres lotes y con análisis en triplicado de cada lote. La eficiencia de asociación (EA%) de insulina en los nanocomplejos se analizó tras separar los nanocomplejos del medio de suspensión y su análisis directo e indirecto. Para ello, 1 mL de la formulación se ultracentrifugó (Beckman Coulter, Optima L-90K, Brea, EEUU, rotor 70.1Ti) a 70,000 rpm (RCF media 336,140 g) durante 3h a 15ºC, tras lo cual se obtiene un sedimento de los nanocomplejos separado del medio de suspensión. Tras separar el sobrenadante, el pellet se disolvió en TFA 0,1% para inducir la disociación del complejo insulina-Zn. Se analizaron alícuotas tanto del sobrenadante (cuantificación indirecta) como del pellet disuelto en TFA (cuantificación directa), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un método reverso isocrático en un equipo Agilent (1100 series LC, con detector de red de diodos fijado a 214 nm, Santa Clara, EEUU), con una columna C18 (Superspher® RP-18 endcapped) como fase estacionaria. La EA% se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EA(\%) = \frac{Cantidad\ de\ insulina\ en\ los\ nanocomplejos\ aislados}{Cantidad\ total\ de\ insulina}\ x100$$

La capacidad de carga o asociación (loading capacity, % p/p) se calculó dividiendo la cantidad de insulina asociada (AE x Insulina total en la formulación) por el peso total de los nanocomplejos.

Tabla 1. Propiedades de los nanocomplejos Insulina-Zn

Diámetro (nm)	PDI	ZP (mV)	Asociación (%)	Eficiencia de asociación (%)
76±15	0,3	-15±3	92,6	91,2±3,7

La evaluación morfológica se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión (TEM, CM12, Philips, Holanda), para lo cual las muestras se depositaron en rejillas de cobre y se tiñeron con ácido fosfotúngstico (2% p/v en buffer acetato 500 mM pH 5,5, para evitar la disociación del complejo a pH ácido), durante 2 min y se dejaron secar durante la noche en un desecador. La morfología del complejo se muestra en la figura 1.

Ejemplo 2. Recubrimiento de los nanocomplejos Insulina-Zn.

Los nanocomplejos se optimizaron con un recubrimiento de su superficie con objeto de proveerlos con propiedades adicionales, principalmente dirigidas a controlar la estabilidad coloidal en medios biológicos, la liberación de la proteína asociada y a mejorar la mucodifusión. Se ensayaron con éxito varios recubrimientos diferentes:

- combinación del surfactante neutro polietilenglicol estearato 40 (PEG st) y el surfactante catiónico etil lauroil arginato (LAE).
- combinación del surfactante neutro polietilenglicol estearato 40 (PEG st) y el surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

Ejemplo 2.1. Recubrimiento con LAE y PEG st

El recubrimiento con PEG st y LAE se lleva a cabo mediante la adición de soluciones de estos excipientes sobre la suspensión de los nanocomplejos preparados según el ejemplo 1, bajo agitación. La estructura del recubrimiento se entiende como una capa de surfactante: los grupos positivamente cargados de LAE interaccionarían con la superficie cargada negativamente de los nanocomplejos, con lo que las colas hidrofóbicas de LAE quedarían orientadas hacia el exterior. Estas colas interaccionarían a su vez con las colas hidrofóbicas de PEG st, que consecuentemente dejarían los grupos polares PEG orientados hacia el medio exterior. Esta conformación queda reflejada en el cambio en valores de potencial zeta (ZP) de los nanocomplejos desde valores negativos hacia la neutralidad a medida que la concentración de surfactantes se incrementa y en estudios de RMN.

Propiedades fisicoquímicas

Los valores de potencial zeta (ZP) se determinaron a partir de los valores de movilidad electroforética por Doppler anemometry (LDA) en un equipo Malvern Zetasizer (NanoZS ZEN 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, UK), equipado con un haz de luz roja láser (λ = 632,8 nm). Las formulaciones se midieron directamente sin diluir a 25ºC, al menos en tres lotes y con análisis en triplicado de cada lote. Ver resultados en la figura 2A.

La distribución de tamaños de partícula y el PDI, potencial zeta (ZP) y eficiencia de asociación (EA%) de insulina en los nanocomplejos se determinaron de acuerdo con la metodología ya descrita en el ejemplo 1.

Tabla 2. Propiedades de los nanocomplejos Insulina-Zn antes y después de la estabilización mediante recubrimiento con la combinación seleccionada de recubrimiento LAE – PEG st.

Propiedades	*Diámetro (nm)*	*PDI*	*ZP (mV)*	*Asociación (%)*	*Eficiencia de asociación (%)*	*Posibilidad de concentrar la suspensión*
Nanocomplejos no recubiertos	76±15	0,3	-15±3	92,6	91,2±3,7	No
Nanocomplejos recubiertos	83±7	0,4	0,4±0,8	10,0	95,2±5,3	Sí

La evaluación morfológica se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión se realizó del modo descrito en el ejemplo 1, y la morfología de estos nanocomplejos recubiertos se muestran en la figura 3.

Ejemplo 2.2. Recubrimiento con CTAB y PEG st.

El recubrimiento con CTAB y PEG st se realizó siguiendo el método descrito en el ejemplo 2.1. Se obtuvieron las medidas de potencial Zeta en función de la cantidad de material de recubrimiento como se muestra en la figura 2B.

Ejemplo 2.3. Marcaje fluorescente

La formulación preparada en el ejemplo 2.1. ha sido marcada fluorescentemente para ser testada en estudios de biodistribución adicionales.

Para marcar la insulina, se preparó una solución de 10 mg/mL de insulina en tampón bicarbonato 0.1M pH 8,58, sobre el cuál se añadieron bien a) 100 µL de una solución 10 mg/mL de FITC en etanol, o bien b) 50 µL de una solución 10 mg/mL Cy5-NHS en DMSO, gota a gota bajo agitación magnética (300 rpm). Se mantuvo la mezcla bajo agitación magnética (300 rpm) durante 1h y en la oscuridad, tras lo cual se purificó la insulina marcada de los restos de fluoróforo mediante columnas de filtración en gel (PD10). Seguidamente se indujo la precipitación de la insulina marcada mediante ajuste del pH a su pI (5,49), se centrifugó (10 min, 4ºC, 15.000g) y se descartó el sobrenadante para retirar las sales del tampón. Finalmente, se resuspendió el pellet de insulina marcada en agua ultrapura y se liofilizó para su conversión a polvo.

Ejemplo 2.4. Estudio de la cubierta

La estructura de la cubierta de LAE – PEG st del nanosistema preparado según el ejemplo 2.1 se elucidó empleando técnicas de RMN. El planteamiento esquemático de la estructura de la cubierta descrito en el ejemplo 2.1 se representa esquemáticamente en la figura 4A. Para confirmar la disposición de cubierta y descartar que se traten de agregados o que no haya una interacción real entre la cubierta y el complejo, se llevaron a cabo experimentos de waterLOGSY (*Water-Ligand Obserbed via Gradient SpectroscopY*), para lo cual debieron obtenerse previamente los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN) del

nanosistema y sus componentes así como de Espectroscopía de Orden Difusional (DOSY NMR)

Para ello, se analizaron muestras de la suspensión de nanocomplejos recubiertos así como soluciones de cada uno de los componentes del sistema por separado a la misma concentración y en el mismo medio de dispersión que los nanosistemas, midiéndose en tubos estándar convencionales de 5 mm a 25º. Los espectros de RMN se obtuvieron con un espectrómetro Varian Inova 17.6T (Agilent) operando a frecuencia de protón de 750 MHz, y se procesaron con el software MestreNova v10.0.1 tomando como referencia el pico de TMS ($\delta = 0$ ppm). Se aplicaron filtros de difusión para suprimir el solvente (WATERGATE, 1d ^{1}H Dfilter) en todas las muestras para atenuar el pico del agua y de potenciales impurezas de bajo peso molecular en las muestras. Los experimentos waterLOGSY se llevaron a cabo aplicando un pulso de inversión de 180º sobre la señal del agua a 4,7 ppm mediante un pulso selectivo sincronizado de 1, 2 y 3 ms y tiempo de mezclado de 0,5s, para evaluar el entorno químico de los grupos de relevancia y poder elucidar su posición en la nanoestructura.

Los espectros de RMN del nanosistema y sus componentes se muestran en la figura 4B a 4E). Las señales características de los protones $–OCH_2-CH_2-$ de la cadena PEG se localizaron claramente en el espectro de PEG st a 3,64-3,67 ppm (figura 4C). Por otro lado, las señales de los protones correspondientes a las cadenas alifáticas se localizaron fácilmente en los espectros de PEG st (1,26 ppm) y LAE (1,27 ppm) (figura 4C y 4D). La presencia de estas señales se localizó igualmente en el espectro del nanosistema recubierto (protones de los carbonos $–OCH_2-CH_2-$ de grupos PEG a 3,71 ppm y carbonos de cadenas alifáticas a 1,27 ppm) (figura 4E).

Los experimentos DOSY (figura 4F) mostraron un coeficiente de difusión similar para todas las señales obtenidas en el espectro del nanosistema recubierto, sugiriendo que provenían de una misma estructura (nanosistema) y por tanto una contribución mínima o nula de posibles impurezas de surfactante LAE y PEG st no asociados al sistema.

Finalmente, el experimento waterLOGSY (figura 4G) de los nanosistemas recubiertos mostró claramente un pico invertido a 3.71 ppm correspondiente a las regiones de PEG, confirmando su disposición externa en la superficie del nanocomplejo, en contacto con el medio acuoso. Por

otro lado, la señal correspondiente a las cadenas alifáticas de los surfactantes (1,27 ppm) permanecieron sin invertirse, indicando su disposición interna en la estructura. Finalmente, los cambios en la señal invertida de PEG fueron proporcionales a la longitud del pulso aplicado (de 3 a 1 ms, figura 4G), confirmando que el efecto observado era debido al efecto waterLOGSY. En conclusión, los resultados de esta caracterización reforzaron la hipótesis de la estructura adoptada por los surfactantes en la cubierta del nanosistema.

Ejemplo 3. Estudio de la estabilidad de los nanocomplejos recubiertos en Fluido Intestinal Simulado (SIF).

La estabilidad de los nanosistemas recubiertos preparados en los ejemplos 2.1 y 2.2. en SIF se evaluó en función de la evaluación del tamaño y *count rate*. Para ello, la suspensión de nanosistemas se diluyó en el medio de interés a la mayor dilución a la cual el equipo puede obtener una medida dentro del rango de concentración aceptable. Las muestras se incubaron a 37ºC y con agitación horizontal (300 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania). A intervalos definidos (0; 0,5; 1; 2; y 4h), se analizó la evolución del tamaño y distribución de partícula y del *mean count rate* (MCR) (al trabajar con atenuador fijo) o *derived count rate* (DCR) (al trabajar con atenuador automático), ambas indicativas del número de partículas que permanecen en suspensión, en un equipo Malvern Zetasizer (NanoZS ZEN 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Los resultados se muestran en las figuras 5A, 5B y 5C. Los resultados muestran que los nanocomplejos no recubiertos dan lugar a tamaños micrométricos, posiblemente debido a la agregación de los nanosistemas, desde los primeros tiempos de medida (figura 5A). Por el contrario, los nanosistemas recubiertos tanto con LAE y PEG st (figura 5B) como con CTAB y PEG st (figura 5C) son capaces de mantener su tamaño en SIF al menos durante 4h mientras que el *count rate*, indicativo del número de partículas que permanecen en suspensión, se mantuvo inalterado, confirmando así la estabilidad coloidal de los nanosistemas recubiertos en este medio.

Ejemplo 4. Estudio de liberación

Para estudiar la liberación de insulina desde los nanocomplejos no recubiertos preparados en el ejemplo 1 y nanocomplejos recubiertos preparados en el ejemplo 2.1. y suspendidos en SIF, la suspensión de los mismos se diluyó en SIF (1:5) y se incubó a 37ºC con agitación horizontal (300 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania). A intervalos

definidos (0; 0,5; 1; 2; y 4h), alícuotas de 1 mL se ultracentrifugaron (Beckman Coulter, Optima L-90K, Brea, EEUU, rotor 70.1Ti) a 70,000 rpm (RCF media 336,140 g) durante 3h a 15ºC, tras lo cual se obtiene un sedimento de los nanocomplejos recubiertos, conteniendo la insulina no liberada, separado del medio de suspensión. Tras separar el sobrenadante, el pellet se disolvió en TFA 0.1% para inducir la disociación del complejo insulina-Zn. Los nanocomplejos no recubiertos, donde no se observa ningún pellet, se procesaron de igual modo. Se analizaron tanto el sobrenadante (cuantificación indirecta) como el pellet disuelto en TFA (cuantificación directa), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un método reverso isocrático, en un equipo Agilent (1100 series LC, con detector de red de diodos fijado a 214 nm, Santa Clara, EEUU), con una columna C18 (Superspher® RP-18 endcapped) como fase estacionaria.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6A y 6B, confirmando que los nanosistemas no recubiertos liberan prácticamente la totalidad de la insulina a los 30 min (figura 6A), mientras que los nanosistemas recubiertos según el ejemplo 2.1 son capaces de controlar la liberación de insulina en SIF al menos durante 4h (figura 6B), período especialmente adecuado para la administración oral ya que éste es el tiempo estimado de tránsito intestinal a lo largo del intestino delgado, zona en la que se estima mayor absorción. Por otro lado, debe mencionarse que la mayoría de los nanotransportadores de proteínas y péptidos descritos en la literatura difícilmente presentan esta cualidad, ya que frecuentemente presentan problemas de liberación prematura o *burst release* (Müller, Mäder and Gohla, 2000; Santalices *et al.*, 2017).

Ejemplo 5. Evaluación de la protección frente a proteólisis de los nanocomplejos recubiertos.

Este ensayo se llevó a cabo cuantificando la cantidad de insulina que permaneció sin degradar tras incubar la formulación con SIF suplementado al 1% p/v con pancreatina (4 USP) (SIF-p). Para ello y de forma previa al estudio, se prepararon diluciones seriadas de SIF-p y una solución de insulina en el medio de suspensión de los nanocomplejos y se incubaron durante 20 min (37ºC, agitación horizontal a 300 rpm), tras lo cual se paró la reacción de degradación añadiendo HCl 0,1N y colocando la mezcla en hielo. A continuación, la insulina no degradada se analizó por HPLC (método descrito en secciones anteriores) y el ratio de pancreatina – insulina al cuál el tiempo de vida media de insulina ($t_{1/2}$) fue de ≈20 min se seleccionó para continuar el estudio. Para la evaluación de la proteólisis, se mezclaron 250 µL de 1) la suspensión de nanocomplejos

recubiertos descrita en el ejemplo 2,1; 2) una solución de insulina a la misma concentración y en el mismo medio de dispersión que la formulación (PBS 5 mM), y 3) sólo medio de dispersión (control negativo de pancreatina), con SIF-p de acuerdo con el ratio de pancreatina-insulina seleccionado previamente y se incubaron a 37ºC con agitación horizontal (300 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania). A intervalos definidos (0; 0,5; 1 y 2h), se paró la actividad enzimática añadiendo 300 µL de HCl 0.1N a cada alícuota, lo que también provocó la disrupción de los nanocomplejos mediante disociación a pH ácido, y se colocó la mezcla resultante en hielo. La cantidad remanente de insulina se analizó mediante HPLC siguiendo el método descrito en secciones anteriores.

Los resultados obtenidos (ver Figura 7) mostraron un claro efecto de protección de la formulación frente a la degradación enzimática, donde la insulina libre se degradó en un 76.2% respecto de su concentración inicial en tan sólo 30 min, mientras que la insulina asociada a los nanocomplejos no bajó a estos niveles hasta 2h tras el inicio del estudio.

Ejemplo 6. Liofilización del complejo Insulina-Zn recubierto y estudio de estabilidad durante el almacenamiento.

Los nanocomplejos recubiertos obtenidos en el ejemplo 2.1. se liofilizaron en presencia de diferentes concentraciones de crioprotector (trehalosa). Para ello se mezcló una suspensión de nanocomplejos recubiertos junto con soluciones concentradas de trehalosa (1:1) bajo agitación magnética (300 rpm), tras lo cual la mezcla se congela inmediatamente a -80ºC y seguidamente se liofiliza (Genesis VirTis 25EL pilot lyophilizer). El producto (polvo liofilizado) obtenido se almacenó a temperatura ambiente en un desecador. Para reconstituirlo, se le añadió agua ultrapura en el volumen correspondiente a la concentración inicial de nanocomplejos previa mezcla con el crioprotector, y se favoreció la resuspensión en un vórtex (30s). La caracterización físico-química de la suspensión resultante se llevó a cabo según la metodología previamente descrita en el ejemplo 1, y se seleccionaron concentraciones de crioprotectores a las cuales se obtuvieron parámetros físico-químicos similares a la formulación original (ver figura 8).

Los nanocomplejos recubiertos, liofilizados con trehalosa y reconstituídos a su forma original con agua ultrapura, demostraron poder ser concentrados mediante ultrafiltración hasta x4,69 y mantener su tamaño inicial hasta 24h a temperatura ambiente.

Este estudio se llevó cargando sistemas de ultrafiltración previamente filtrados con agua ultrapura (Centrifugal Filter Units Amicon Ultra – 15 (ref. UFC 903024) con 14 mL de formulación liofilizada reconstituida. Seguidamente, los sistemas se centrifugaron en períodos consecutivos de 3 min (Centrífuga Eppendorf, modelo 5430 R, 4,000 rcf, 15ºC), entre los cuales se homogeneizó el concentrado y se tomaron alícuotas para análisis de concentración de insulina por HPLC (método correspondiente descrito en secciones anteriores) y mantenimiento del tamaño de partícula (medida de tamaño y PDI, método correspondiente descrito en secciones anteriores).

Tabla 3. Concentración de insulina estimada y concentración de insulina analizada (HPLC) en la formulación liofilizada y reconstituida en función del tiempo de centrifugación.

Tiempo	**Volumen recuperado**	**Concentración estimada**	**Concentración analizada**		**Pérdida de insulina**
			IU/mL		
(min)	**(mL)**	**(IU/mL)**	**Promedio**	**Desviación estándar**	**(%)**
0	14,0	18,3	18,9	1,4	-3,3
3	12,0	21,3	20,5	0,9	3,7
6	9,0	28,3	25,0	0,3	11,8
9	8,0	31,6	34,7	3,9	-9,6
12	6,0	41,9	42,4	1,4	-1,3
15	5,0	49,7	49,5	1,6	0,5
18	4,0	61,4	54,3	1,6	11,6
21	3,5	69,1	66,6	4,6	3,7
24	3,0	79,3	71,3	3,5	10,0
27	2,0	116,5	90,4	1,1	22,4
30	1,6	141,3	103,7	2,2	26,6
33	1,4	155,4	120,3	2,6	22,6
36	1,0	208,2	139,4	0,8	33,1

Se evaluó la estabilidad coloidal a temperatura ambiente de las formulaciones concentradas cuatro (x4) y ocho (x8) veces desde su volumen inicial, mediante medida de tamaño, PDI y *count rate* (equipo Malvern Zetasizer, método descrito en ejemplo 1). Las formulaciones concentradas x8 mantuvieron su tamaño inicial durante 48h en forma coloidal y a temperatura ambiente, mientras que las concentradas x4 lo hicieron durante 24h. Ver figura 9.

Ejemplo 7. Interacción con tejidos intestinales *in vivo*.

La biodistribución *in vivo* de los nanocomplejos recubiertos obtenidos en el ejemplo 2.1 se estudió marcando radiactivamente la formulación y seguidamente administrándola vía oral a ratas que se visionaron mediante tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT/CT). Los animales (ratas Wistar, 250 g) se alojaron y cuidaron bajo condiciones estándar con acceso libre a agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo protocolos previamente aprobados por las guías del Comité Ético y de Bioseguridad de la Universidad de Navarra.

Para el marcaje de los nanosistemas, formulaciones previamente liofilizadas con trehalosa se concentraron desde 0,64 mg/mL a 1.71 mg/mL de concentración final de insulina para asegurar la administración de un volumen adecuado para administración oral. Esto se llevó a cabo mediante sistemas de ultrafiltración (Amicon Ultra 30KDa, con membrana de celulosa regenerada Ultracel® de baja adhesión) centrifugados a 5.000 g y RT en períodos de 2 min (Mikro® 20, Hettich®, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Germany), previniendo la formación de agregados y/o adsorción a las membranas mediante pipeteo suave, y controlando el mantenimiento del tamaño de partícula (equipo NanoS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Los nanosistemas se radiomarcaron adaptando un protocolo previamente descrito (Areses *et al.*, 2011): 750 µL de formulación concentrada se mezclaron con 40 µL de una solución acidificada de 0.5 mg/mL $SnCl_2$ (2mM HCl en agua Romil-Sps) para la consiguiente reducción de especies de tecnecio en un vial cerrado, que se purgó con helio durante 5 min para minimizar el contenido de oxígeno y evitar la oxidación del estaño pre-reducido. A continuación, se añadieron 210 µL del eluente generador de $^{99m}TcO_4^-$ en 0,9% p/v NaCl al vial y la mezcla se dejó reaccionar durante 30 min a RT. Seguidamente, se abrió el vial y se llevó a cabo el control de calidad del marcaje mediante radiocromatografía de capa fina (ITCL). Para esto, se depositaron 2 µL de la muestra obtenida sobre una tira Whatmann 3MM

(1x15cm) y se desarrolló con NaCl 0,9% p/v hasta 14 cm, y la pureza radiquímica se determinó con un sistema radiocromatográfico MiniGita (Raytest GmbH, Dortmund, Alemania). Previamente a la administración, cada dosis individual de la formulación radiomarcada (260 µL) se mezcló con 70 µL de PBS 22.5 mM para asegurar la estabilidad durante el paso por el estómago. Ratas macho de raza Wistar (n = 4) se mantuvieron en ayunas durante 12h antes de los experimentos y se les administró una dosis oral de 330 µL de la formulación final radiomarcada (equivalente a 50 IU/Kg de dosis de insulina) o tecnecio libre como control, ambas dosificaciones equivalentes a 250 µCis por rata (evaluado con activímetro ATOMLAB 500, Biodex®, Shirley NY, EEUU). Los animales se anestesiaron con gas isoflurano 2% (flujo de oxígeno de 0,2 L/min) y visionados en un equipo SPECT-CT (Symbia, Siemens Medical System, USA) a 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h. Ver figura 10.

Los nanosistemas radio-marcados permanecieron principalmente en el intestino delgado (hasta 2h) y en el ciego durante la duración del estudio, mientras que el control de tecnecio libre permaneció en el estómago (ver figura 10A y 10B). Este perfil de tránsito intestinal muestra la retención de los nanosistemas en la sección del ciego a los tiempos de 4h, 8h y 11h concuerda con los tiempos de tránsito estimados en el modelo animal de rata y en humanos, donde la velocidad del transporte del contenido intestinal es mucho menor en los segmentos distales que en los proximales. Debe notarse también que la anestesia con isoflurano está relacionada con la reducción de la motilidad en el tracto GI y los tiempos de tránsito debido a la relajación muscular.

Ejemplo 8. Preservación de la bioactividad de la proteína asociada en la formulación tras los procesos de formulación y también de liofilización.

La bioactividad de la proteína en los nanosistemas descritos en el ejemplo 8 antes y después de liofilizar se llevó a cabo mediante administración subcutánea (s.c.) de una dilución de la formulación en PBS 5 mM a una dosis correspondiente a 1 IU/Kg a ratas Sprague-Dawley, y comparación del perfil de glicemia obtenido frente a la administración de una dosis 1 IU/Kg de la misma insulina sin procesar. Ratas Sprague-Dawley (250-300g) se obtuvieron del Animalario Central, Universidad de Santiago de Compostela (España). Se mantuvieron bajo ciclos de 12h luz/12h oscuridad y se alimentaron con una dieta estándar para roedores (Panlab A04, laboratorios Panlab). Todos los experimentos fueron revisados y aprobados por el Comité

Ético de la Universidad de Santiago de Compostela (ref. 1500AE/12/FUN01/FIS02/ CDG3), de acuerdo con las regulaciones Europea y Española para el uso de animales en estudios animales, y por lo tanto llevados a cabo en cumplimiento con la Directiva 2010/63/EU del Consejo y Parlamento Europeo. Los resultados (Figura 11) mostraron el mismo perfil glucémico en todos los casos, indicando que la bioactividad de la insulina se mantuvo intacta tras los procesos de producción de los nanosistemas y su liofilización.

Ejemplo 9. Efecto farmacológico en ratas sanas y ratas diabéticas

Ratas Sprague-Dawley (250-300g) se obtuvieron del Animalario Central, Universidad de Santiago de Compostela (España). Se mantuvieron bajo ciclos de 12h luz/12h oscuridad y se alimentaron con una dieta estándar para roedores (Panlab A04, laboratorios Panlab). Todos los experimentos fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela (ref. 1500AE/12/FUN01/FIS02/ CDG3), de acuerdo con las regulaciones Europea y Española para el uso de animales en estudios animales, y por lo tanto llevados a cabo en cumplimiento con la Directiva 2010/63/EU del Consejo y Parlamento Europeo.

En el caso de ratas sanas, una semana antes del experimento, se les aplicó una implantación quirúrgica de un catéter intestinal con el extremo proximal de la cánula tunelado subcutáneamente para salir desde la parte posterior del cuello, y se suturaron. Se les permitió a los animales recuperarse durante 6 días y se monitorizaron en función de su estado general y peso diariamente. Antes de la administración, se mantuvieron en ayunas con libre acceso a agua durante 4h, y se tomaron muestras de sangre (tiempo 0h) desde la vena caudal inmediatamente antes de la administración para tomar los niveles basales de glucosa con un glucómetro de mano (Glucocard™ G+meter, Arkray Factory, Japón). Sólo los animales con niveles basales iguales o superiores a 70 mg/dL se utilizaron para el estudio. A continuación, se aplicaron inyecciones intestinales de bien los sistemas recubiertos descritos en el ejemplo 2.1 o bien una solución de insulina en el mismo medio de dispersión (control negativo) a dosis de 50 IU/Kg (n = 6). Los valores de glicemia se monitorizaron a cada hora hasta el final del estudio.

En el caso de ratas diabéticas (T1DM), las ratas se diabetizaron 7 días antes del experimento. Para ello, se mantuvieron en ayunas durante la noche con libre acceso a agua, tras lo cual se les administró una inyección intraperitoneal (i.p.) de STZ 60 mg/Kg en buffer citrato sódico (50

mM, pH 4,5), preparado en el momento y usado inmediatamente. El procedimiento de diabetización se aplicó una segunda vez en los animales que presentaran valores normoglicémicos (<150 mg/dL) después de 48h. Las ratas se mantuvieron con dieta estándar durante 7 días con monitorización diaria del estado general, peso y valores de glucosa en sangre mediante muestra de la vena caudal. A aquellas ratas que presentaran valores de glucosa por encima de 500 mg/dL, se les administró una inyección s.c. de insulina 1 IU/Kg para prevenir la muerte de los animales por hiperglicemia, excepto el día antes del experimento. Antes del experimento, las ratas se mantuvieron en ayunas durante la noche (12h) y los niveles basales de glucosa se analizaron mediante toma de muestra de la vena caudal y medición en glucómetro. Aquellos animales con valores iniciales mayores de 250 mg/dL se consideraron diabéticos y empleados en el estudio, mientras que aquellos con valores bajo 250 mg/dL o sobre 599 mg/dL (límite máximo de medida del glucómetro) se descartaron. A continuación, se anestesiaron los animales con gas isoflurano 2% (flujo de oxígeno de 0,2 L/min), se abrió una incisión en la cavidad abdominal para localizar el intestino e inyectar intraintestinalmente bien los nanocomplejos descritos en el ejemplo 2.1 o bien una solución de insulina libre en el mismo medio de dispersión (control negativo) a dosis 50 IU/Kg (n = 8). Seguidamente, se suturaron los animales y se les permitió despertar, tras lo cual se les monitorizó los valores de glucemia a cada hora y hasta la finalización del estudio.

Los resultados obtenidos en el modelo normoglicémico (ver figura 12) muestran una reducción modesta pero significativa en los niveles de glucosa de hasta un 42% referido a los valores iniciales, mantenida hasta 6h. De este modo se confirmó que la insulina asociada al nanosistema se internalizó y alcanzó la circulación sanguínea en cantidad suficiente como para ejercer una bajada prolongada de los niveles de glucosa.

En el caso del modelo de rata diabética (ver figura 13), se obtuvo un importante descenso de la glucemia de hasta 80% referido a los valores iniciales, con claras diferencias en comparación con el control negativo, y alcanzando al menos 8h de efecto. En conclusión, los resultados ofrecieron un efecto mucho más claro en comparación con el modelo de rata normoglucémico, confirmando en ambos modelos la absorción de insulina desde los nanocomplejos recubiertos tras su administración intestinal.

Ejemplo 10. Estudio de escalado

La formulación preparada en el ejemplo 2.1 se ha escalado exitosamente desde volúmenes de producción de 2 mL a volúmenes de 20 y 200 mL mostrando propiedades similares tras su caracterización.

Las propiedades de la formulación liofilizada se mantuvieron durante 2 meses de almacenamiento.

Ejemplo 11. Preparación de nanocomplejos con tRNA-Zn.

Para preparar nanocomplejos de tRNA-zinc, se prepararon 500 µL de una solución de tRNA en HCl 0,01N a concentración 0,1 µg/mL, sobre los que se añadió una solución de zinc acetato 20 mg/mL en volumen correspondiente a un ratio de carga 5:1 ó 10:1 (moles de zinc : nucleótido). Se mantuvo la mezcla bajo agitación magnética (300 rpm) y se le añadió Na0H 0.1N hasta alcanzar pH neutro, tras lo cuál se incubó durante 3h a 4ºC. Seguidamente se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 4 min para dejarla atemperar, se vorteó durante 10s, y se midió su tamaño y potencial zeta (ZP).

Ratio de carga (Zn:tRNA)	Tamaño (nm)	PDI	ZP (mV)	Replicados
5:1	92,9 ± 18,8	0,379	N/A	n = 3
10:1	174,2 ± 7,5	0,292	-21,5 ± 3,6	n = 8

Ejemplo 12. Preparación de nanocomplejos con tRNA-Fe de carga negativa recubiertos con diferentes moléculas con carga positiva.

Se preparó una solución de tRNA en agua (libre de RNasas) a concentración 0.1 mg/mL y una solución de cloruro férrico hexahidrato en tampón acetato 100 mM (pH 6) a concentración 0,246 mg/mL. Seguidamente, se goteó la solución de cloruro férrico sobre la solución de tRNA bajo agitación magnética (1:1), y se mantuvo bajo agitación. Los nanocomplejos resultantes se

caracterizaron midiendo su tamaño y potencial zeta (ZP) y la asociación de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v, 100V, 20 min).

Para recubrir los nanocomplejos, se goteó la formulación sobre una solución de polímero de recubrimiento con carga positiva (0,1 mg/mL poliarginina (pArg) o 1 mg/mL quitosano) en agitación (1:1), y se mantuvo bajo agitación magnética.

Los nanocomplejos recubiertos resultantes se caracterizaron midiendo su tamaño y potencial zeta (ZP) y la asociación de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v, 100V, 20 min).

Formulación	**Tamaño (nm)**	**PDI**	**ZP (mV)**	**Replicados**
No recubierta	147,9 ± 9,5	0,320	-24,2 ± 0,3	n = 3
Recubierta con pArg	174,9 ± 6,9	0,223	+29,2 ± 0,7	n = 3

Formulación	**Tamaño (nm)**	**PDI**	**ZP (mV)**	**Replicados**
No recubierta	137,9 ± 23,4	0,272	-24,0 ± 0,3	n = 3
Recubierta con quitosano	150,4 ± 6,4	0,238	+25,0 ± 0,4	n = 3

Ejemplo 13. Preparación de nanocomplejos con tRNA-Fe de carga positiva recubiertos con diferentes moléculas con carga negativa.

Se preparó una solución de tRNA en agua (libre de RNasas) a concentración 0.1 mg/mL y una solución de cloruro férrico hexahidrato en buffer acetato 100 mM (pH 6) a concentración 2,216 mg/mL. A continuación se goteó la solución de tRNA sobre la solución de cloruro férrico bajo agitación magnética (1:1), y se mantuvo bajo agitación. Los sistemas se caracterizaron

midiendo su tamaño y potencial zeta (ZP) y la asociación de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v, 100V, 20 min)

Para recubrir los nanocomplejos, se goteó la formulación sobre una solución de polímero de recubrimiento con carga negativa (2 mg/mL de ácido hialurónico (HA), condroitín sulfato (CS), copolímero de polietilenglicol y ácido poliglutámico (PEG(5k)-PGA(10) o ácido polisiálico (PSA)) en agitación (1:1), y se mantuvo bajo agitación magnética. Los sistemas resultantes se caracterizaron midiendo su tamaño y potencial zeta (ZP) y la asociación de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v, 100V, 20 min).

Formulación	**Tamaño (nm)**	**PDI**	**ZP (mV)**	**Replicados**
No recubierta	113,5 ± 4,4	0,226	+16,4 ± 0,5	n = 3
Recubierta con HA	197,9 ± 8,7	0,202	-31,1 ± 0,5	n = 3
Recubierta con CS	190,1 ± 4,9	0,185	-44,6 ± 0,4	n = 3

Formulación	**Tamaño (nm)**	**PDI**	**ZP (mV)**	**Replicados**
No recubierta	114,2 ± 10,7	0,243	+16,5 ± 0,7	n = 3
Recubierta con PEG(5k)-PGA(10)	142,8 ± 28,8	0,248	-3,1 ± 0,3	n = 3
Recubierta con PSA	117,2 ± 1,2	0,216	-26,8 ± 0,8	n = 3

REIVINDICACIONES

1. Nanosistema caracterizado por estar constituido por:
   (i) un complejo que comprende a) un poliaminoácido o un polinucleótido caracterizado por tener carga negativa y b) un metal, y
   (ii) una cubierta que comprende al menos una molécula con carga,
   con la condición de que la carga neta del complejo (i) es opuesta a la carga de la molécula de la cubierta.
2. Nanosistema según la reivindicación 1 donde el poliaminoácido se selecciona de entre un péptido, una proteína y un anticuerpo monoclonal.
3. Nanosistema según las reivindicaciones 1-2, donde el metal tiene una valencia igual o mayor a +2.
4. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el metal se selecciona de entre zinc, hierro, calcio, magnesio, cobre, cromo, manganeso, níquel, rutenio, bario, estroncio, bismuto, platino, zirconio, germanio, titanio, molibdeno, cobalto y estaño.
5. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado además por tener forma cúbica u ortoédrica.
6. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde la proteína se selecciona de entre hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores hematopoyéticos, enzimas, receptores, péptidos antigénicos, proteínas antigénicas, factores de coagulación, moléculas de adhesión y receptores celulares.
7. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde el anticuerpo monoclonal se selecciona de entre elotuzumab, panitumumab, trastuzumab, bevacizumab, adalimumab, ritusimumab y anticuerpos anti-TNF.
8. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polinucleótido se selecciona de entre ARN transferente, ARN interferente, ARN de silenciamiento, ADN, oligonucleótidos antisentido, micro-ARN y ARN bicatenario.
9. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula con carga de la cubierta se selecciona de entre tensioactivos ionizables o con un grupo funcional con carga, polímeros ionizables o con un grupo funcional con carga, polisacáridos ionizables, poliaminoácidos ionizables, homo y co-polímeros conteniendo residuos ionizables, y sus combinaciones.

10. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cubierta puede comprender además moléculas no ionizables y sin carga.

11. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las moléculas no ionizables y sin carga se seleccionan de entre tensioactivos no iónicos, polímeros sin carga, polialcoholes, y sus combinaciones.

12. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene un tamaño medio inferior a 200 nm, preferiblemente inferior a 170 nm, más preferible inferior a 120 nm.

13. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 2-12, donde la proteína es insulina y el metal es zinc.

14. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 2-12, donde el polinucleótido es un tARN y el metal es hierro.

15. Nanosistema según la reivindicación 1, que consiste en insulina, zinc, estearato de polietilenglicol y etil lauroil arginato y que tiene un diámetro medio inferior a 120 nm.

16. Nanosistema según la reivindicación 1, que consiste en insulina, zinc, estearato de polietilenglicol y bromuro de cetiltrimetilamonio y que tiene un diámetro medio inferior a 120 nm.

17. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por estar en forma liofilizada.

18. Procedimiento para la obtención de un nanosistema según la reivindicación 1, que comprende añadir una disolución de al menos una molécula ionizable o con carga, a un complejo que comprende a) un poliaminoácido o un polinucleótido caracterizado por tener carga negativa, y b) un metal,
con la condición de que la carga neta del complejo es opuesta a la carga de la molécula ionizable o con carga.

19. Procedimiento para la preparación del complejo descrito en la reivindicación 18, que comprende
    a) mezclar un poliaminoácido o un polinucleótido, y un metal,
    b) ajustar el pH de la mezcla a un pH igual o superior al del punto isoeléctrico del poliaminoácido,
    c) incubar la mezcla a una temperatura entre 0 y 8ºC,
    d) dispersar la mezcla en un medio tamponado.

20. Complejo que comprende una proteína y un metal de transición y tiene un diámetro medio inferior a 200 nm, preferiblemente inferior a 170 nm, más preferiblemente inferior a 120 nm.

21. Complejo según la reivindicación 20, que consiste en insulina y zinc y que tiene un diámetro medio inferior a 120 nm.

22. Complejo obtenible mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 19.

23. Composición farmacéutica que comprende un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 20-22, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

24. Nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, o composición farmacéutica según la reivindicación 23, para su uso en medicina.

25. Nanosistema o composición farmacéutica según la reivindicación 24, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas a desórdenes hormonales, metabólicos o inmunológicos, procesos inflamatorios, enfermedades degenerativas y tumores.

26. Nanosistema o composición farmacéutica según la reivindicación 24 o 25, para su uso en el tratamiento de diabetes.

27. Nanosistema o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 24-26, para administración por vía oral.

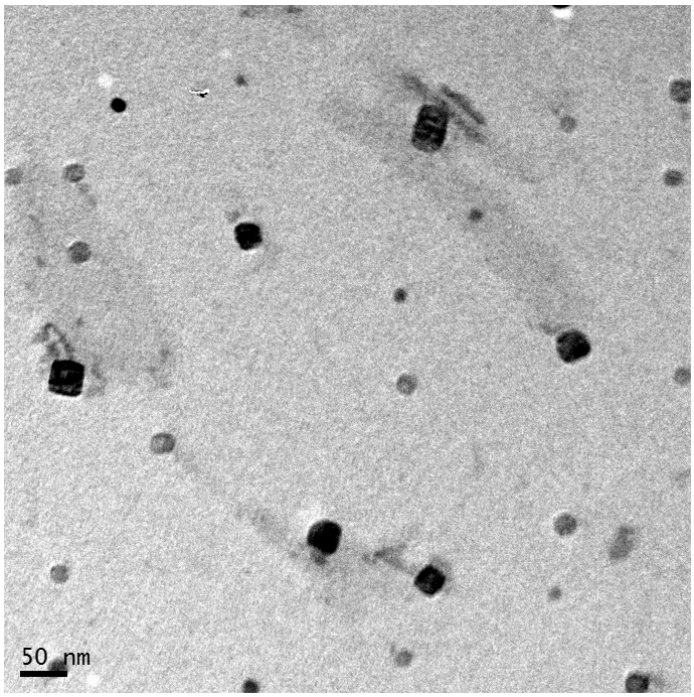

Figura 1

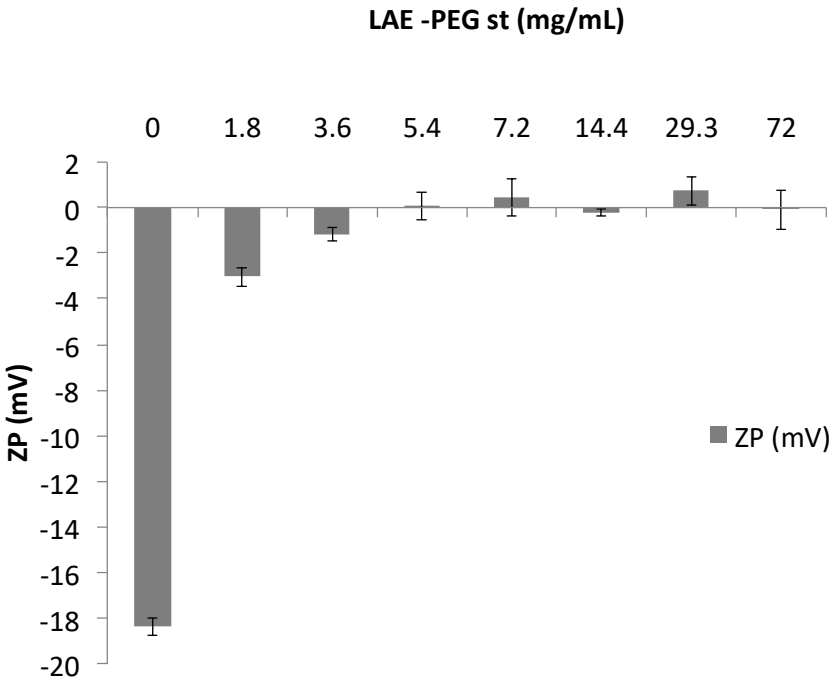

Figura 2A

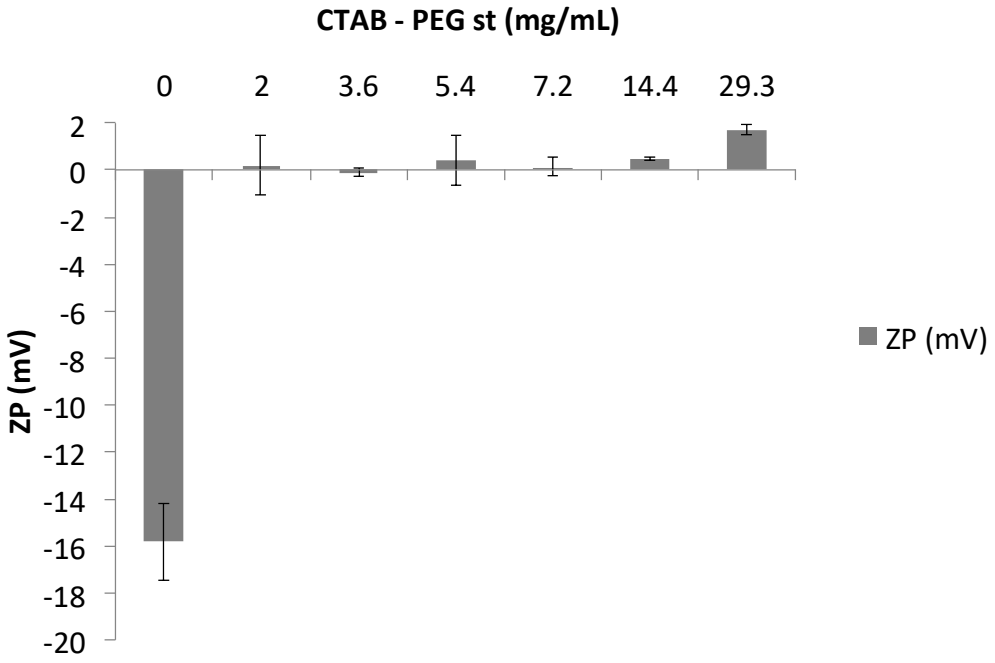

Figura 2B

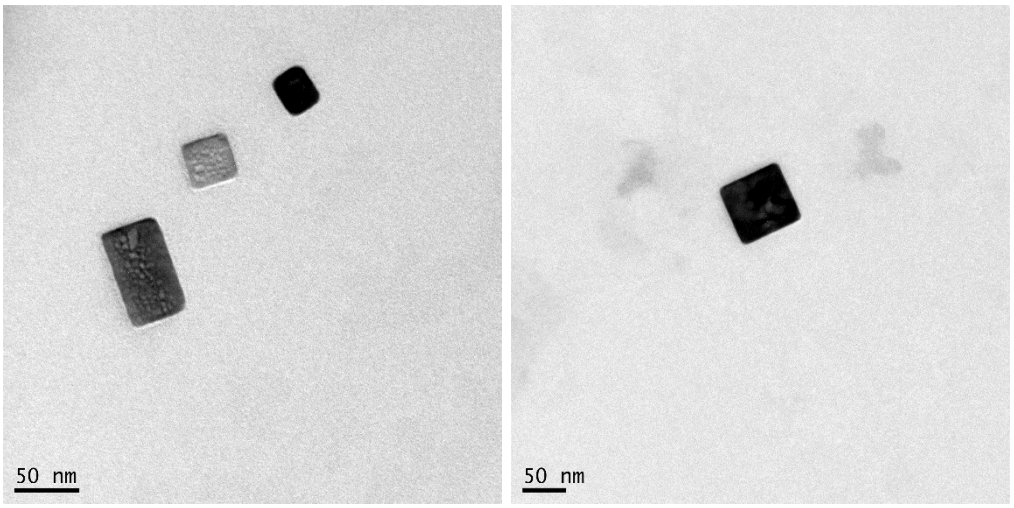

Figura 3

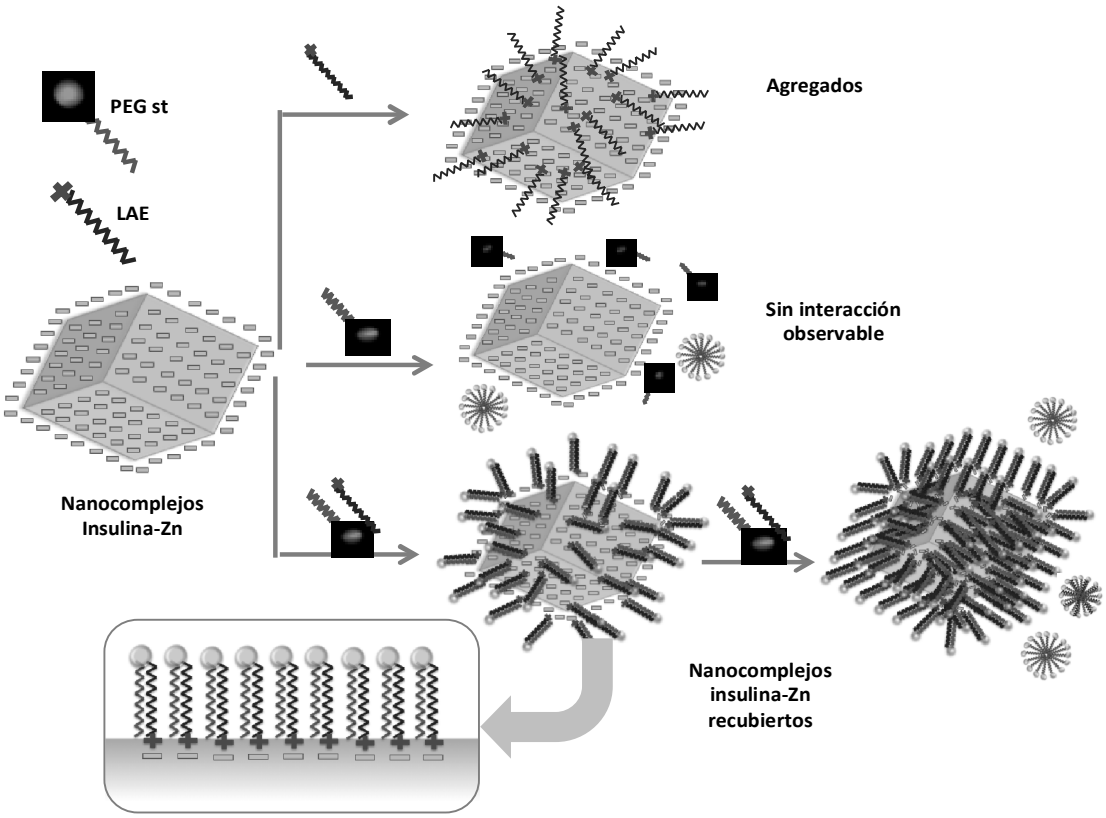
PEG st
LAE
Agregados
Sin interacción observable
Nanocomplejos Insulina-Zn
Nanocomplejos insulina-Zn recubiertos

Figura 4A

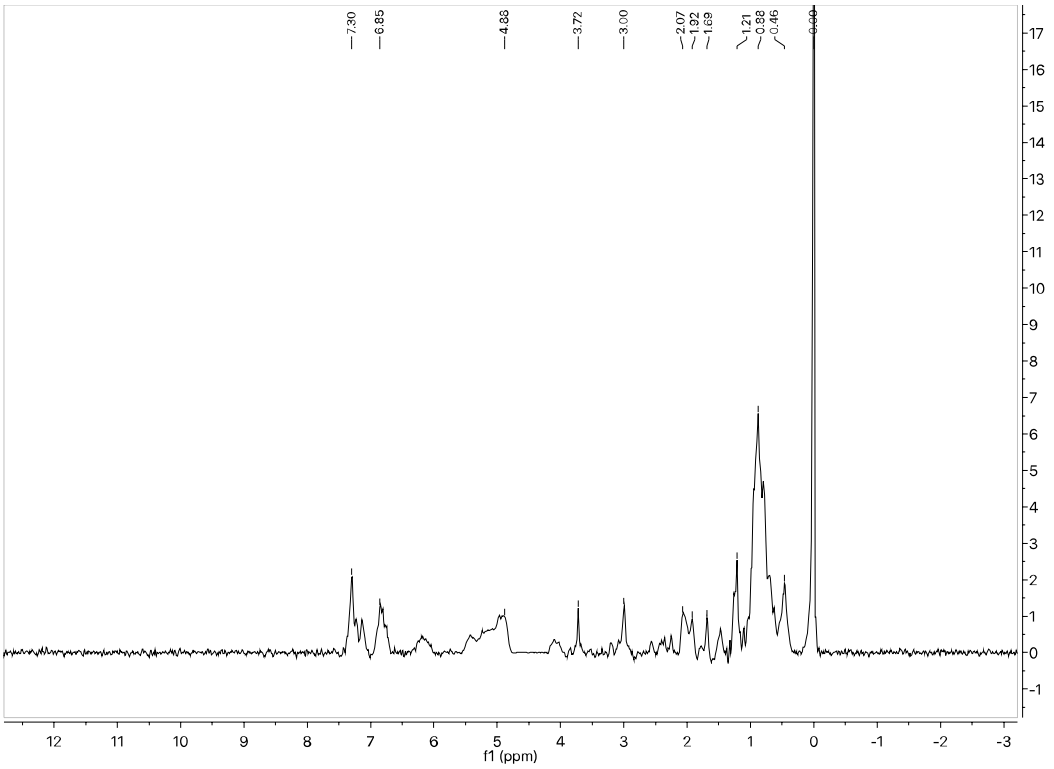

Figura 4B

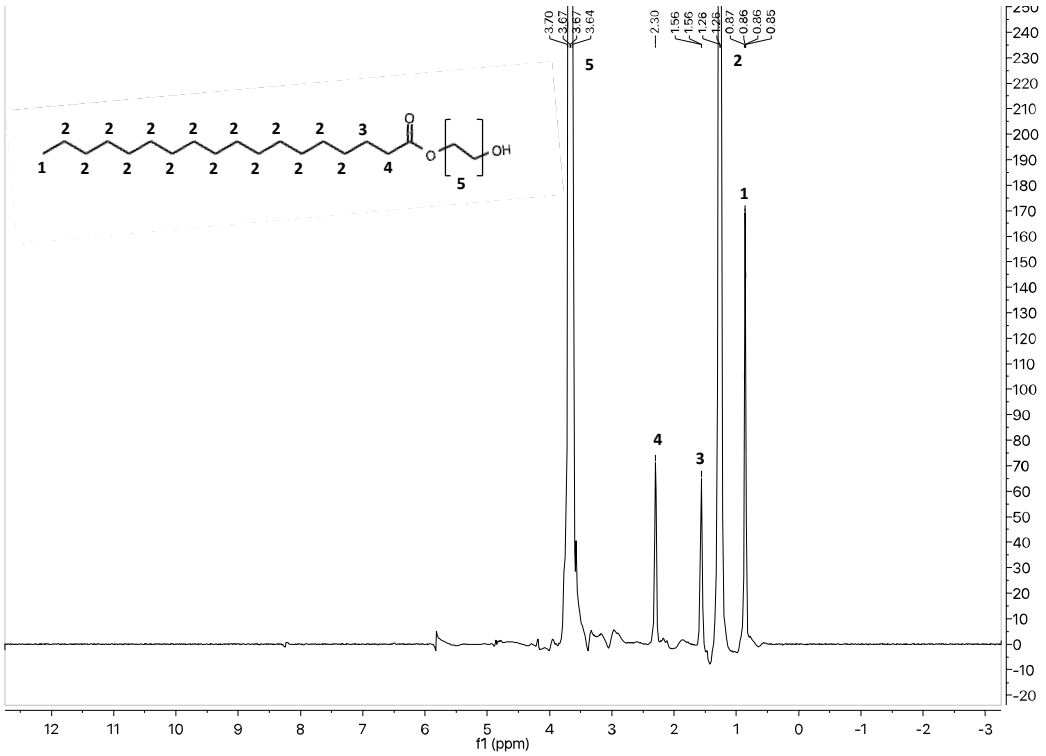

Figura 4C

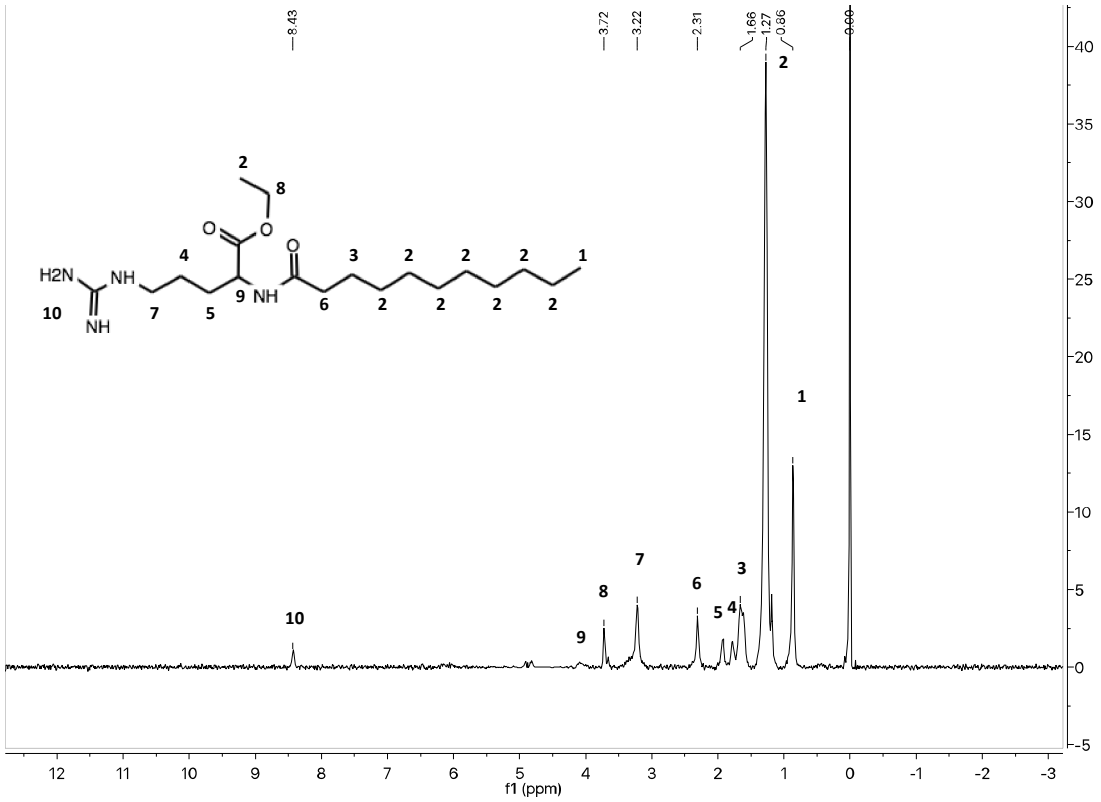

Figura 4D

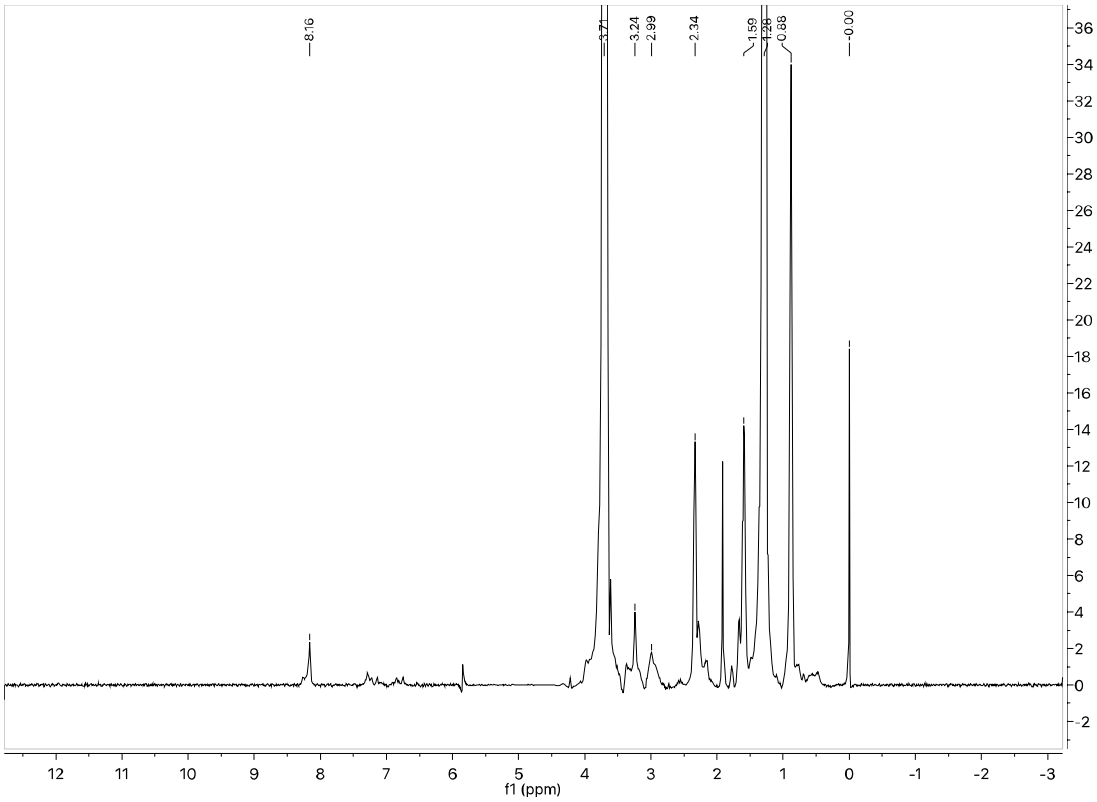

Figura 4E

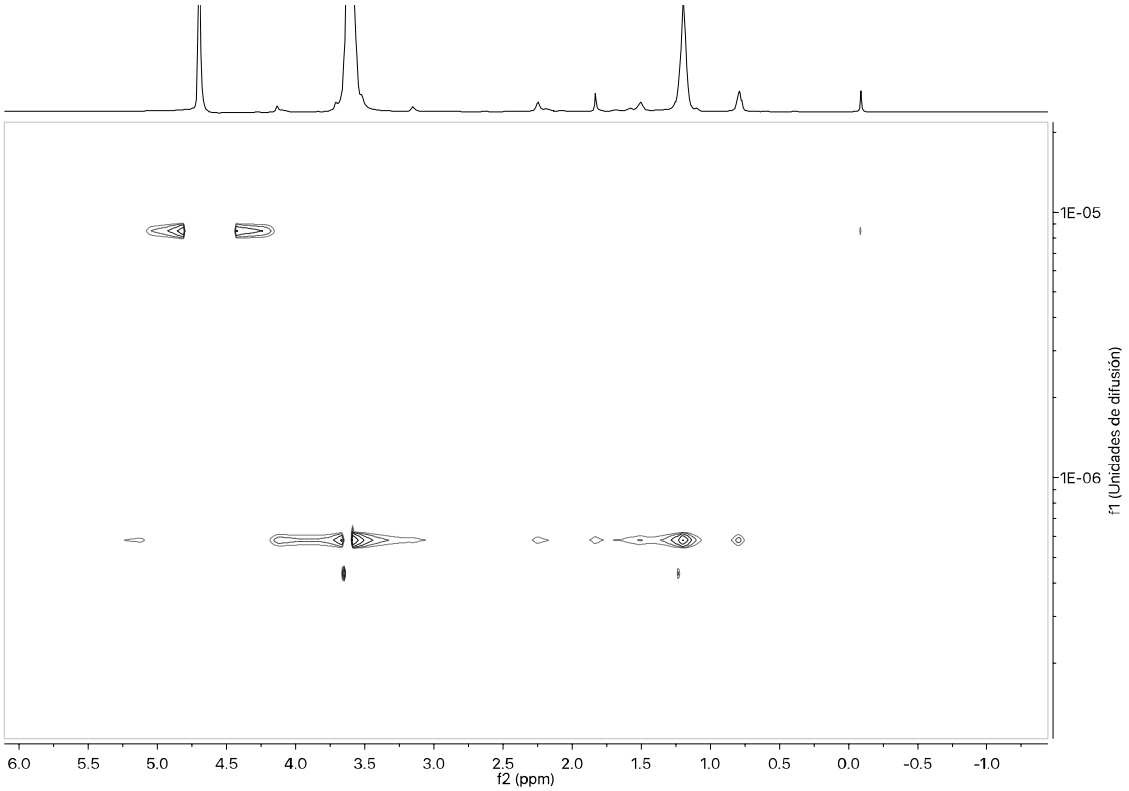
1E-05
1E-06
f1 (Unidades de difusión)
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
f2 (ppm)

Figura 4F

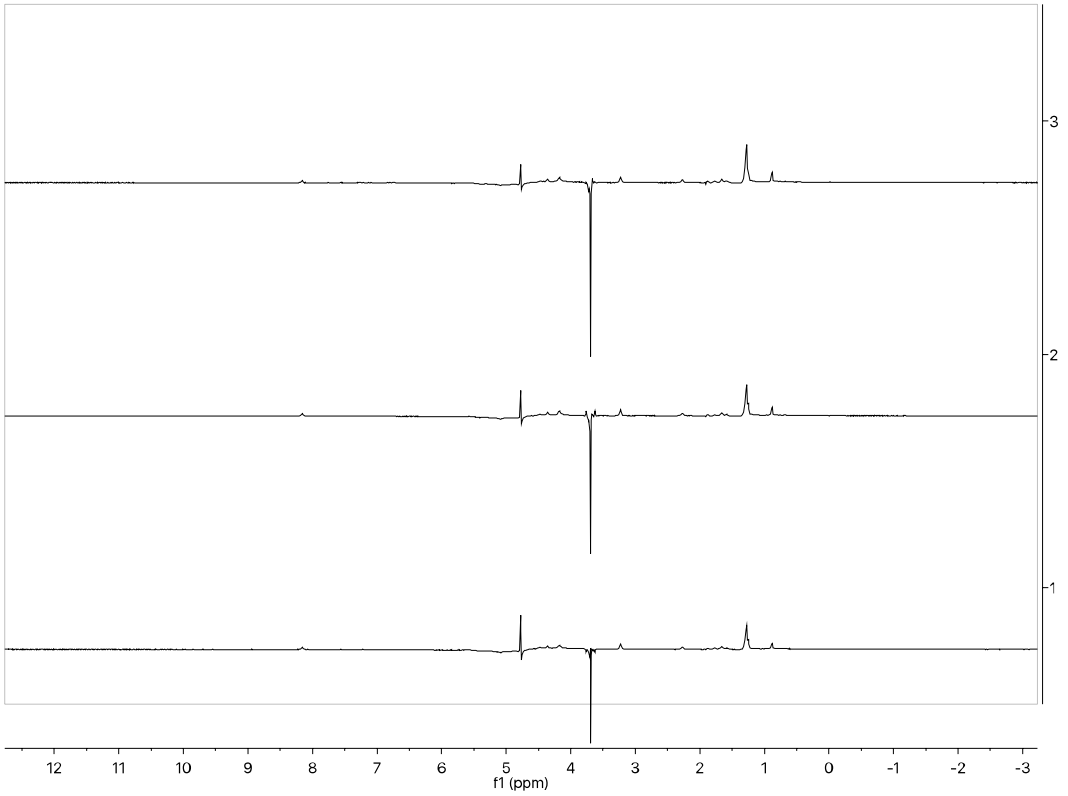

Figura 4G

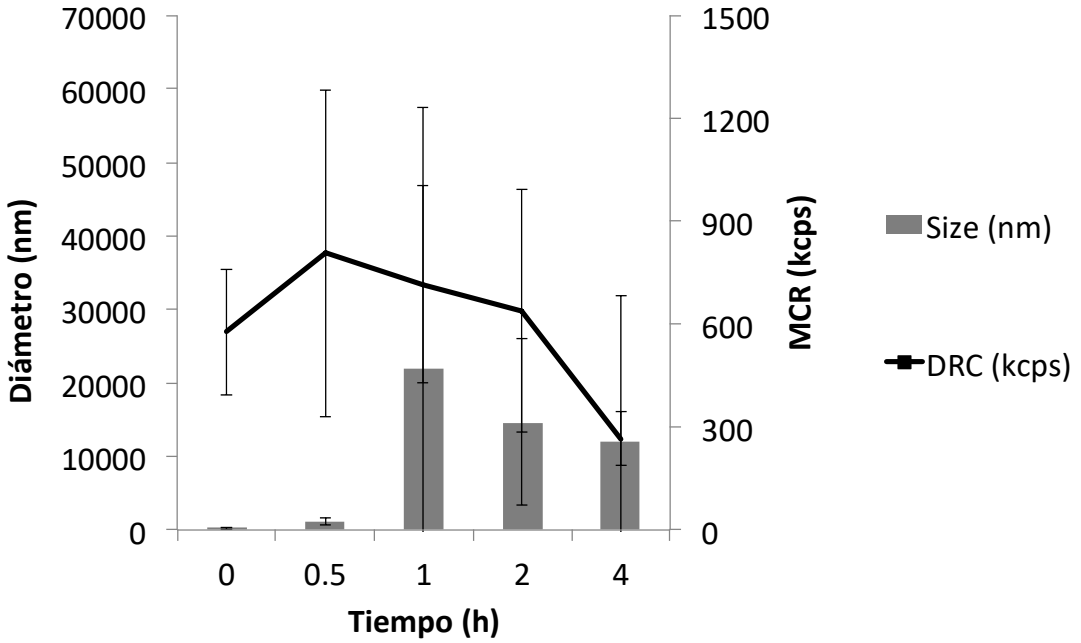

Figura 5A

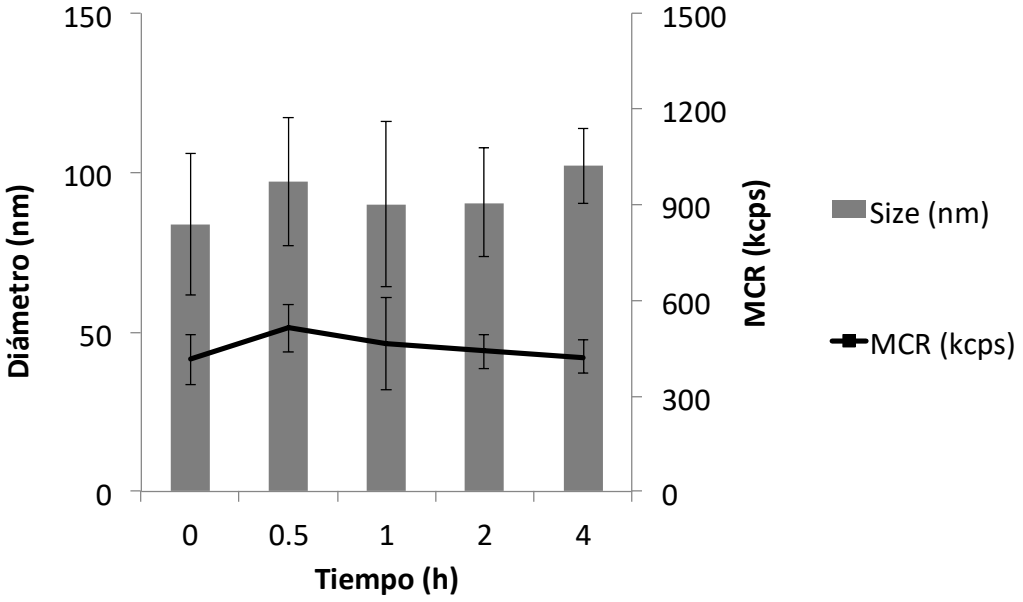

Figura 5B

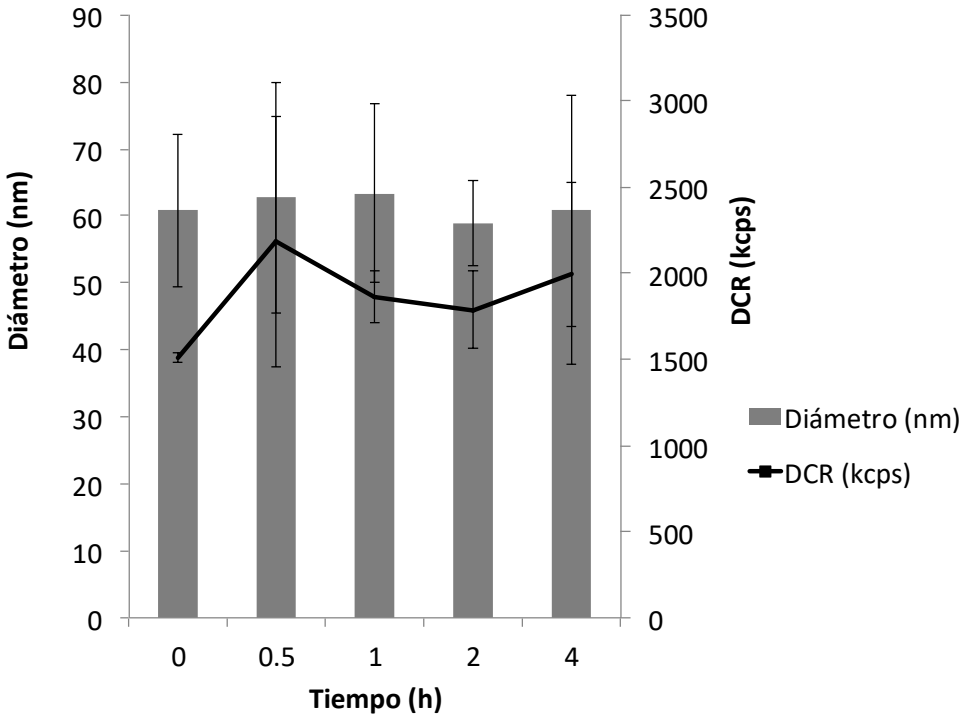

Figura 5C

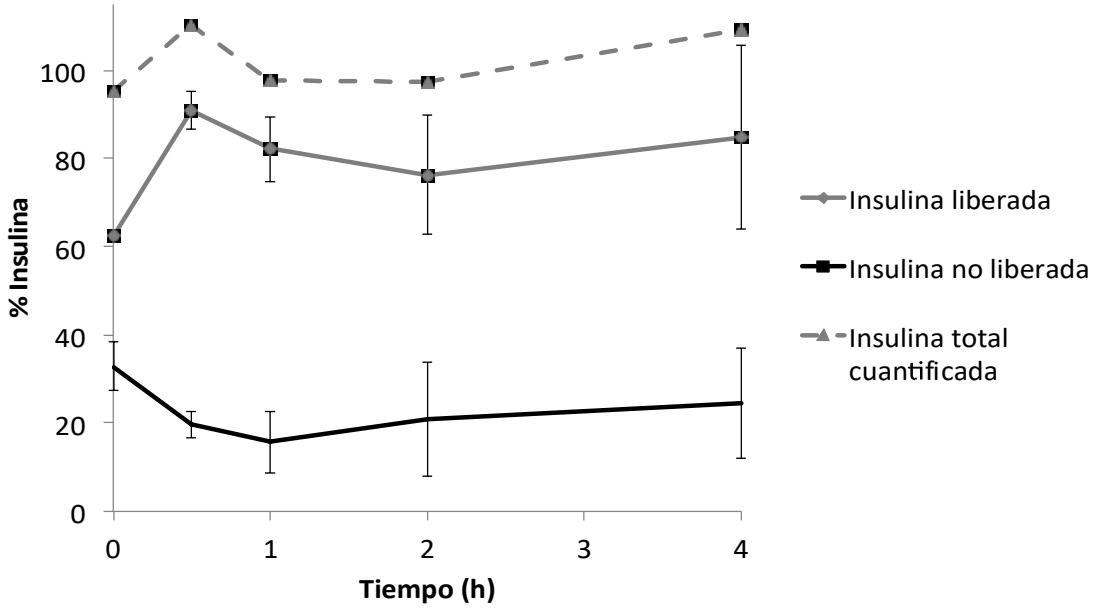

Figura 6A

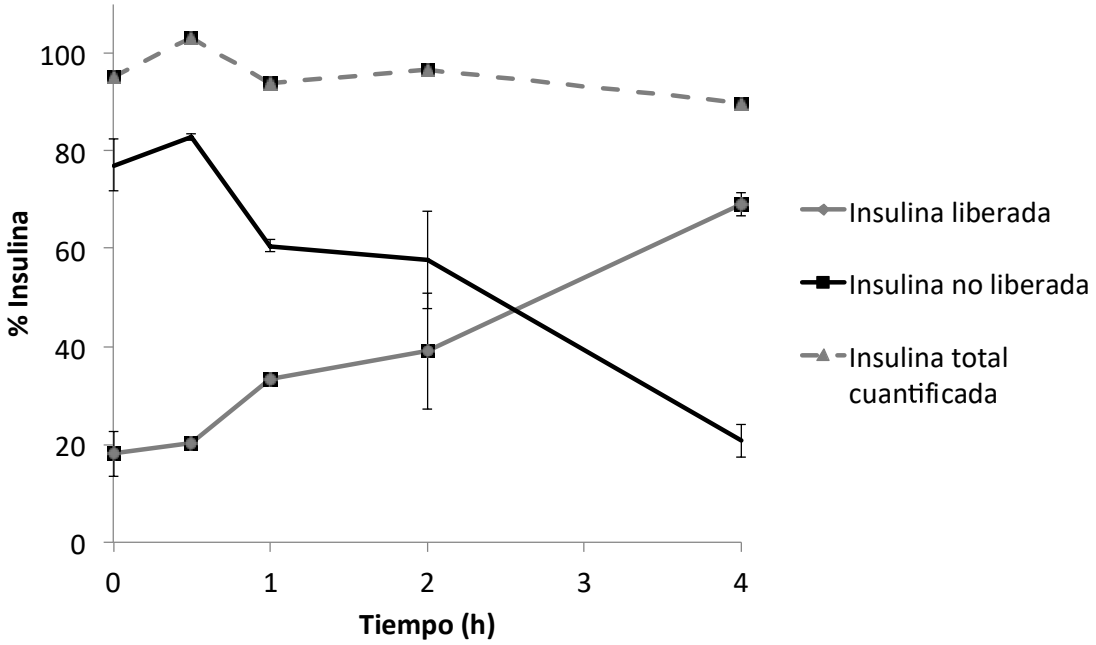

Figura 6B

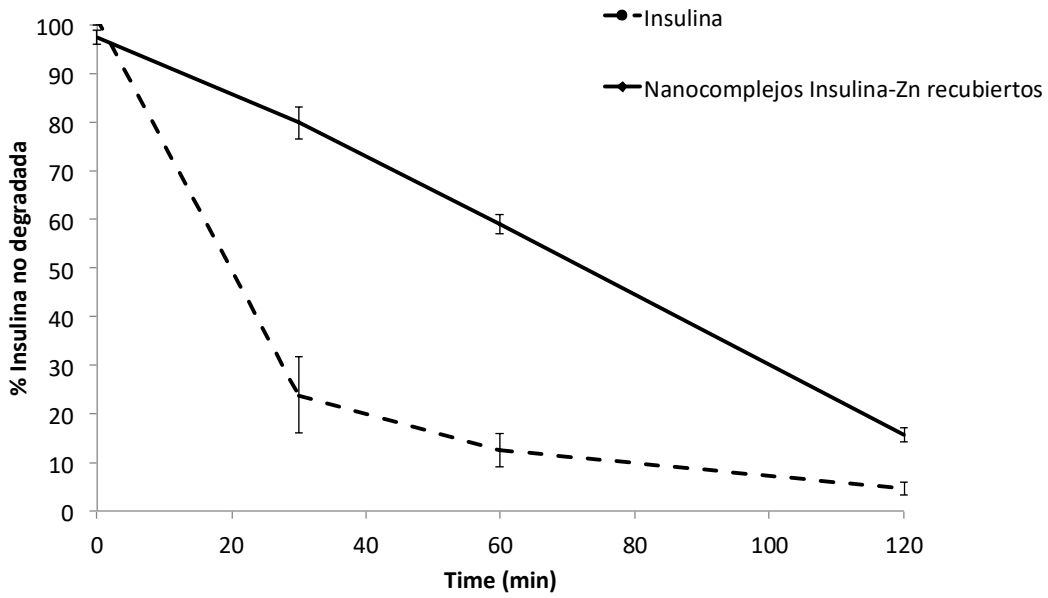
Insulina
Nanocomplejos Insulina-Zn recubiertos
% Insulina no degradada
Time (min)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120

Figura 7

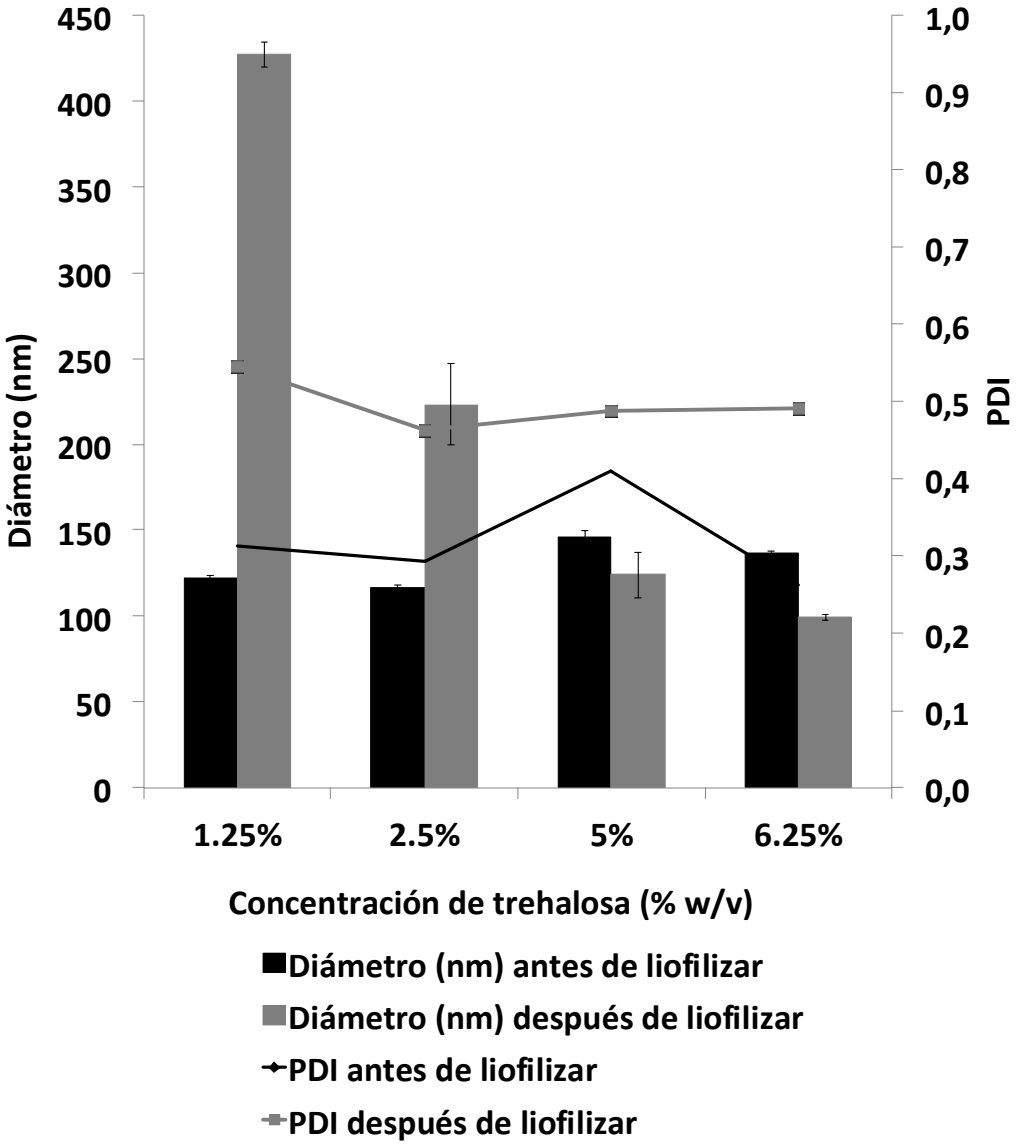
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Diámetro (nm)
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
PDI
1.25%
2.5%
5%
6.25%
Concentración de trehalosa (% w/v)
Diámetro (nm) antes de liofilizar
Diámetro (nm) después de liofilizar
PDI antes de liofilizar
PDI después de liofilizar

Figura 8

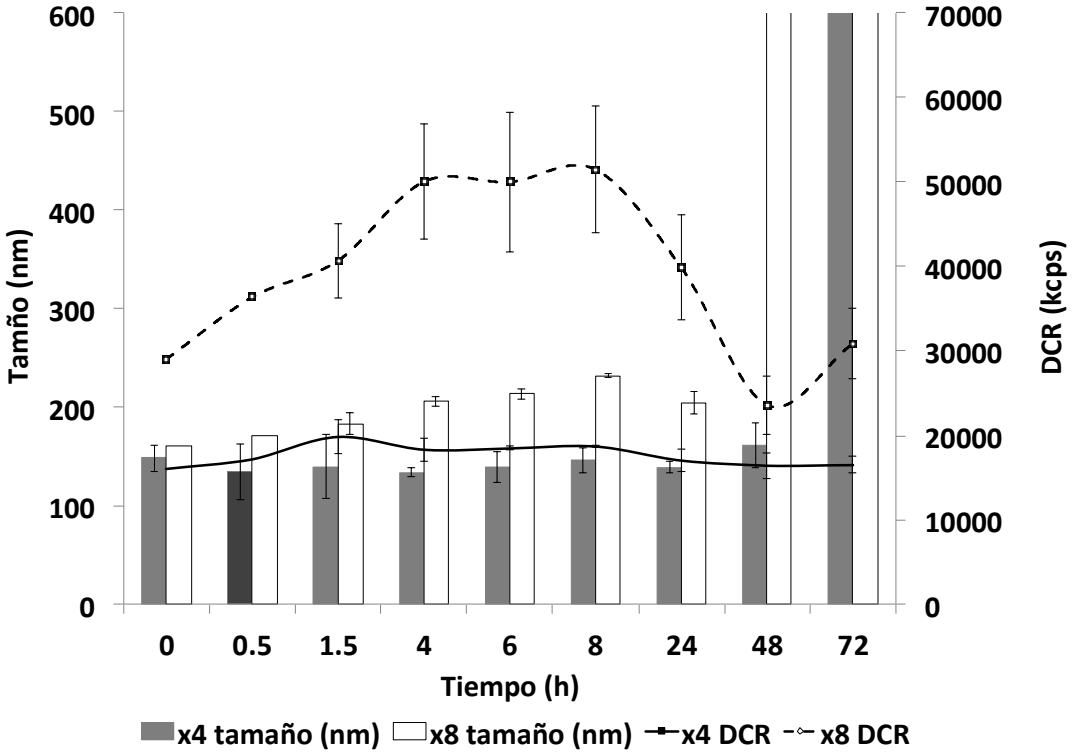
600
500
400
300
200
100
0
Tamño (nm)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
DCR (kcps)
0
0.5
1.5
4
6
8
24
48
72
Tiempo (h)
x4 tamaño (nm)
x8 tamaño (nm)
x4 DCR
x8 DCR

Figura 9

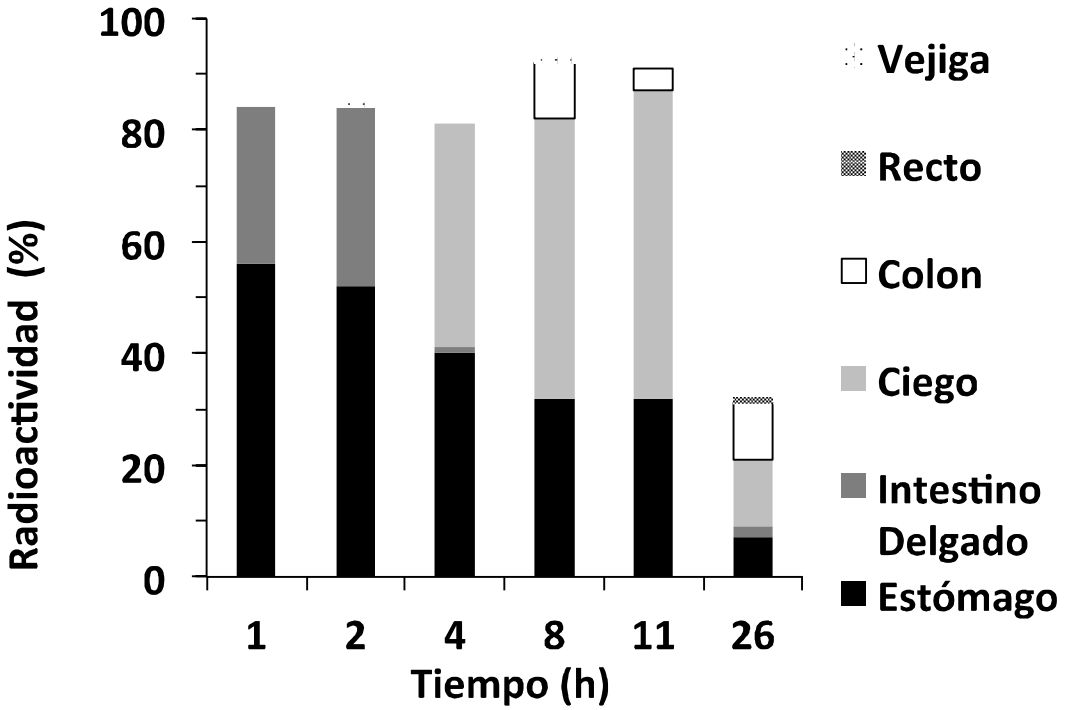

Figura 10A

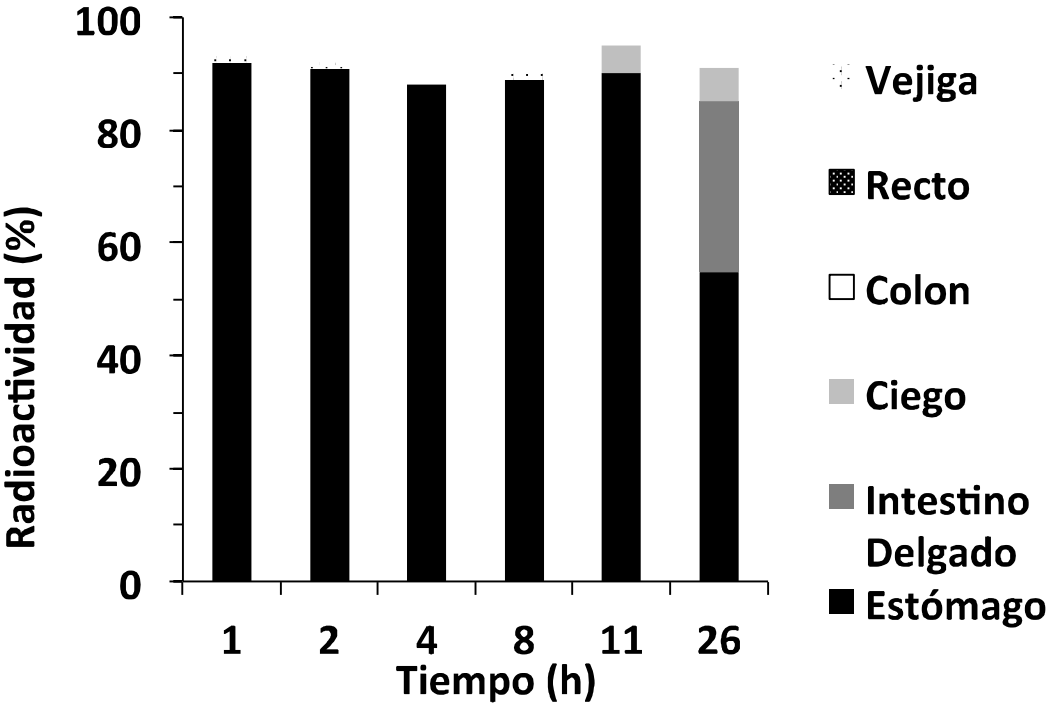

Figura 10B

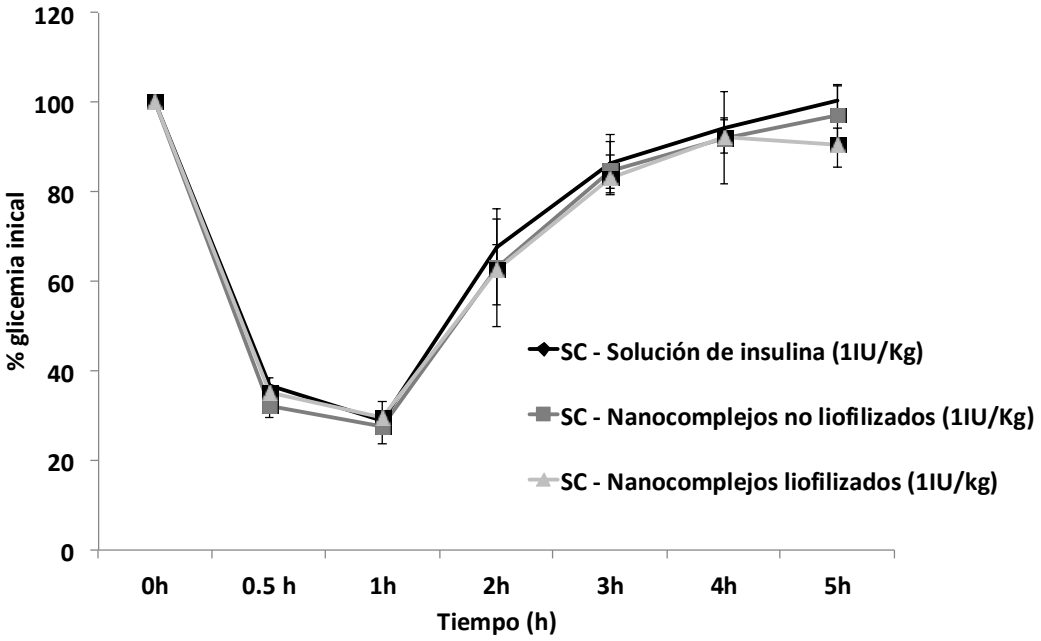
120
100
80
60
40
20
0
% glicemia inical
0h
0.5 h
1h
2h
3h
4h
5h
Tiempo (h)
SC - Solución de insulina (1IU/Kg)
SC - Nanocomplejos no liofilizados (1IU/Kg)
SC - Nanocomplejos liofilizados (1IU/kg)

Figura 11

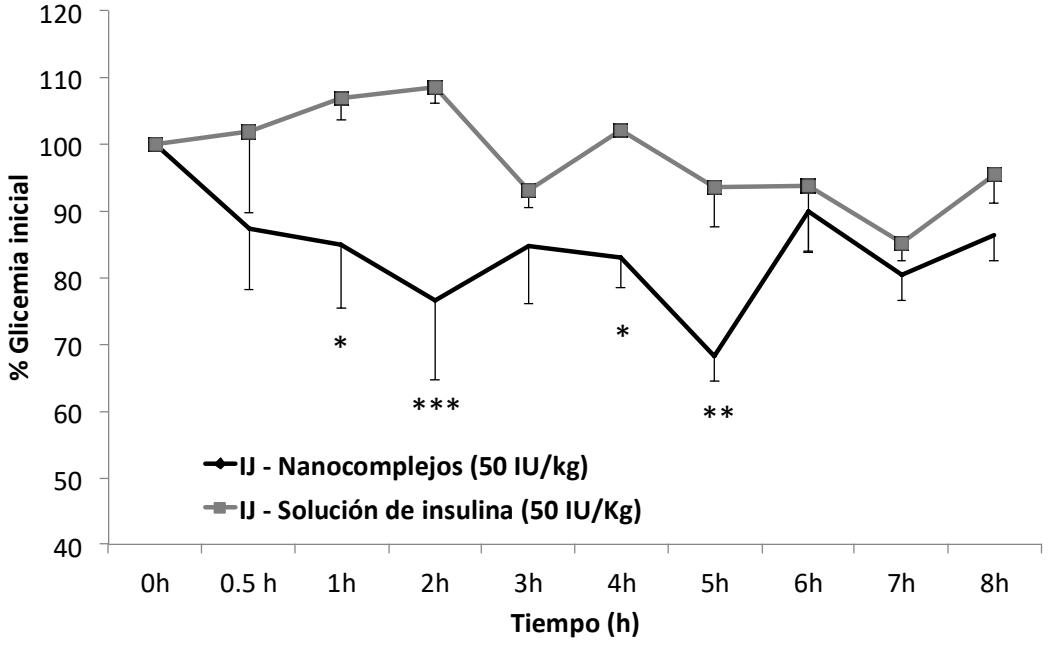

Figura 12

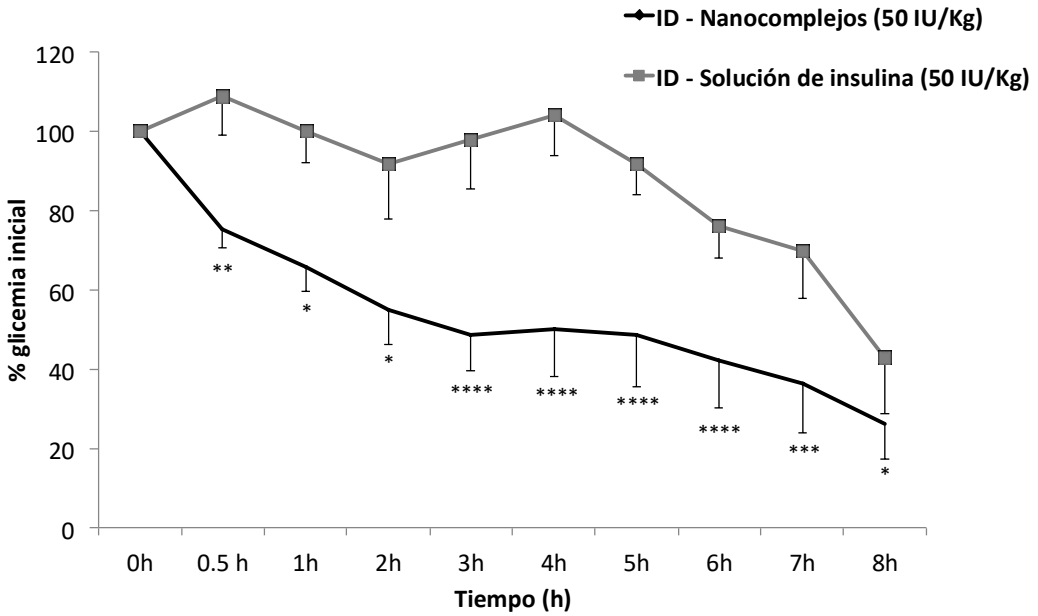

Figura 13