

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 358 703**

21 Número de solicitud: 200902068

51 Int. Cl.:
A61K 9/51 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.11.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.05.2011

62 Número de la solicitud inicial: **P 200703014**

71 Solicitante/s: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Vizcaya, ES**

72 Inventor/es: **Hernández Martín, Rosa María;
Pedraz Muñoz, José Luis y
Igartua Olaechea, Manuela**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Empleo de micropartículas para su uso como vacunas y la liberación de moléculas biológicamente activas.**

57 Resumen:

Empleo de micropartículas para su uso como vacunas y la liberación de moléculas biológicamente activas.

La invención se relaciona con micropartículas a base de un polímero biodegradable de tipo PLGA y un polímero de alginato que encapsulan péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas. Dichas micropartículas, así como las composiciones farmacéuticas derivadas de ellas y sus usos, tienen aplicación en el campo de la salud humana y animal como vacuna y como sistema de liberación de moléculas biológicamente activas.

ES 2 358 703 A1

DESCRIPCIÓN

Empleo de micropartículas para su uso como vacunas y la liberación de moléculas biológicamente activas.

5 Campo de la invención

La invención se relaciona con micropartículas a base de un polímero biodegradable de tipo PLGA y un polímero de alginato que encapsulan péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas. Dichas micropartículas, así como las composiciones farmacéuticas derivadas de ellas y sus usos, tienen aplicación en el campo de la salud humana y animal como vacuna y como sistema de liberación de moléculas biológicamente activas.

Antecedentes

El desarrollo de vacunas eficaces frente a las enfermedades infecciosas representa un reto único para la comunidad científica. No debemos olvidar, sin embargo, que es necesario utilizar nuevos adyuvantes y sistemas de liberación que mejoren la capacidad inmunogénica de los antígenos.

Las *vacunas* (del latín *vaccinus-a-um*, vacuno; de *vacca-ae*, vaca) son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan una respuesta de ataque, denominada anticuerpo (que elimina el antígeno). Esta respuesta genera memoria inmunológica produciendo, en la mayoría de los casos, inmunidad permanente frente a la enfermedad.

En general, se considera que hay cuatro tipos tradicionales de vacunas:

- *Inactivadas*: microorganismos dañinos que han sido tratadas con productos químicos o calor y han perdido su peligro.
- *Vivas atenuadas*: microorganismos que han sido cultivados bajo condiciones concretas para que pierdan sus propiedades nocivas.
- *Toxoides*: son componentes tóxicos inactivados procedentes de microorganismos, en casos donde esos componentes son los que provocan la enfermedad en lugar del propio microorganismo.
- *Subunitarias*: son fragmentos de un microorganismo que pueden generar una respuesta inmunitaria.

Los adyuvantes inmunológicos fueron originalmente descritos como sustancias que utilizadas en combinación con un determinado antígeno producen una respuesta inmune más intensa que cuando se administra el antígeno sólo. El único adyuvante aprobado para su uso en humanos son las sales de aluminio, denominadas genéricamente como Alum; esta sustancia presenta un buen perfil de seguridad pero diversos estudios realizados con diferentes vacunas de naturaleza proteica demuestran que su capacidad adyuvante es bastante limitada y además es un hecho constatado que la respuesta inducida es fundamentalmente humoral, es decir Th2 (Gupta *et al.* 1998, Adv. Drug Del. Rev. 32: 155-172). Además el Alum no es efectivo en la inducción de una respuesta inmunológica a nivel de mucosas. Por último se ha observado que también puede inducir IgE, lo cual ha sido asociado con reacciones alérgicas.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que las micropartículas de PLGA representan una interesante estrategia como vehículo para la administración de vacunas, puesto que controlan la velocidad de liberación del antígeno encapsulado, lo que permite simular repetidas inyecciones de los calendarios convencionales con una única dosis de inmunización (Men *et al.* 1996, Vaccine 14: 1442-1450; Igartua *et al.* 1998, J. Control. Rel. 56: 63-73).

Por otro lado, las micropartículas confieren estabilidad al antígeno, protegiéndolo frente a la hidrólisis enzimática y el pH ácido gástrico, y permitiendo la presencia del antígeno intacto en el lugar de depósito, así como su administración por vías mucosas. Por último, la particulación del antígeno favorece su captación por parte de las células presentadoras de antígenos (APCs) como por ejemplo las células dendríticas, a partir de las cuales se inicia la respuesta inmune. Los estudios de inmunización llevados a cabo con micropartículas de PLGA han demostrado que son capaces de conseguir una buena respuesta de anticuerpos, actividad celular T-citotóxica (CTL), e inducir respuestas Th1/Th2 mixtas.

Por otro lado están los alginatos. Los alginatos son copolímeros naturales de polisacáridos constituidos por los ácidos manurónico y glucurónico. Aunque los polímeros sintéticos superan a los naturales en pureza y reproducibilidad, la ultrapurificación de los alginatos les confiere una baja toxicidad, siendo considerados biocompatibles. Además del importante papel que los alginatos representan en la industria textil y alimenticia, su similitud con la matriz extracelular (ECM) junto con su biodegradabilidad y biocompatibilidad les permite ser ampliamente usados como biomateriales en ingeniería tisular, terapia celular mediante la inmovilización de las mismas y como sistemas de liberación controlada de diversos agentes terapéuticos. Al igual que para el PLGA, numerosos trabajos han descrito la recurrencia a los alginatos como matrices poliméricas para la microencapsulación de péptidos y proteínas. Ejemplos de dichos trabajos se recogen en la patente europea EP1079811.

Las últimas tendencias en el desarrollo de vacunas indican que la captación de antígenos por parte de las células dendríticas es más eficiente cuando las características superficiales de los sistemas microparticulares son diseñadas de acuerdo a los denominados patrones moleculares asociados a patógenos que son secuencias de moléculas pequeñas

que habitualmente presentan los patógenos en su superficie como por ejemplo el lipopolisacárido bacteriano (LPS), péptidoglicanos, ácidos nucleicos, secuencias CpG y RGD. Las secuencias RGD son secuencias de aminoácidos (arginina, glicina y ácido aspártico) que actúan como receptores específicos para integrinas y son capaces de inducir fagocitosis mediada por receptores.

5 En la actualidad se dispone de un amplio abanico de antígenos sintéticos de naturaleza peptídica o proteica que presentan como limitación su baja inmunogenicidad, siendo necesaria su administración conjunta con sustancias adyuvantes y de forma repetida para obtener una respuesta inmune eficaz.

10 En las últimas décadas las micropartículas poliméricas biodegradables se han convertido en un prometedor sistema de liberación de antígenos peptídicos y proteicos para obtener vacunas frente a diversas enfermedades infecciosas:

- 15 • El documento WO9511010 describe métodos y composiciones para la encapsulación de antígenos en microsféricas de PLGA para su utilización como vacunas.
- El documento ES2190350A1 describe una composición de vacuna frente a la brucelosis que comprende micropartículas de poliecaprolactona como adyuvante.
- 20 • El documento WO00/50050 describe formulaciones multiparticulares poliméricas no parenterales como sistema de liberación de agentes terapéuticos profilácticos y diagnósticos a través de mucosas.
- El documento Jin, Xiao Bing; *et al.* Ectopic neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells induced by adenoviral-mediated transfer of hTGF beta2. *Biomaterials* 2007, Vol. 28 (19), 2994-3003, presenta microsferas de alginato embebidas en films de PLGA para su aplicación en ingeniería tisular.
- 25 • El documento Liu, Xiaohua; *et al.* Novel polymeric microspheres containing norcantharidin for chemoembolization. *J. Control. Rel.* 2006, Vol. 116 (1), 35-41, describe microsferas de PLGA-alginato para su aplicación en quimioembolización para el tratamiento de tumores.
- 30 • El documento Wang, Ye; *et al.* Biodegradable and complexed microspheres used for sustained delivery and activity protection of SOD. *J. Biomed. Mat. Res., Part B: Appl. Biomater.* 2006, Vol.79B (1), 74-78, muestra microsferas formadas por al menos un polímero biodegradable (PLGA; alginato o quitosano) y una proteína (superóxido dismutasa).

35 **Compendio de la invención**

La presente invención también contempla la posibilidad de obtener micropartículas que comprenden alginato y PLGA. Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de una micropartícula que comprende las etapas de

- 40 a. preparar una disolución de PLGA en un disolvente orgánico,
- b. preparar una disolución acuosa de alginato,
- 45 c. emulsificar las disoluciones con el péptido o la proteína inmunológicamente activo/activa,
- d. adicionar la emulsión obtenida en el apartado c) sobre una solución que contiene cloruro cálcico y
- e. aislar las micropartículas.

50 La micropartícula obtenible por el método anteriormente descrito, en donde el alginato no se encuentra ligado a un ligando específico para un receptor de superficie, constituye un aspecto adicional de la presente invención, así como todas las aplicaciones y usos derivados de la misma, tales como, su uso como vacuna, en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un individuo, como sistema de liberación de péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas, y formando parte de composiciones farmacéuticas y kit, incluyendo los usos de dichas composiciones y kits.

Breve descripción de las figuras

60 La Figura 1 son unas fotografías de microscopía electrónica de barrido de las diferentes formulaciones de micropartículas elaboradas.

La Figura 2 es una gráfica que muestra el perfil de liberación del antígeno para cada formulación de micropartículas cargadas con SPf66 ó S-3.

65 La Figura 3 es un diagrama de barras que muestra el perfil de títulos de anticuerpos IgG específicos frente a SPf66.

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra el perfil de anticuerpos IgG frente a S-3.

ES 2 358 703 A1

La Figura 5 es un diagrama de barras que representa el ratio IgG2a/IgG1 frente a SPf66 a las 9 semanas de inmunización.

La Figura 6 es un diagrama de barras que representa el ratio IgG2a/IgG1 frente a S-3 a las 9 semanas de inmunización.

La Figura 7 es un diagrama de barras que muestra la secreción de IFN- γ a las 48 horas de la estimulación *in vitro* del cultivo de celular de los nódulos linfáticos de los animales inmunizados con SPf66.

La Figura 8 es un diagrama de barras que muestra la secreción de IFN- γ a las 48 horas de la estimulación *in vitro* del cultivo de celular de los nódulos linfáticos de los animales inmunizados con S-3.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, micropartículas de polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como las micropartículas formadas por PLGA [ácido poli(láctico-glicólico)] más alginato ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular, son capaces no sólo de incrementar la respuesta inmune frente al antígeno encapsulado en la micropartícula, sino que también permiten la administración de péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas por vías menos invasivas, tales como la vía nasal o intradérmica, que las rutas de administración habituales.

Sin tener intención de estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que este efecto es debido a la presencia de alginato en la micropartícula que, en combinación con PLGA, permite una mayor encapsulación de péptidos sintéticos de bajo peso molecular y una menor liberación inicial del péptido, consiguiendo además un incremento de la respuesta inmune inducida frente al péptido o proteína encapsulado (antígeno), además de favorecer la administración de antígenos por vías no invasivas gracias a la mucoadhesividad de los alginatos.

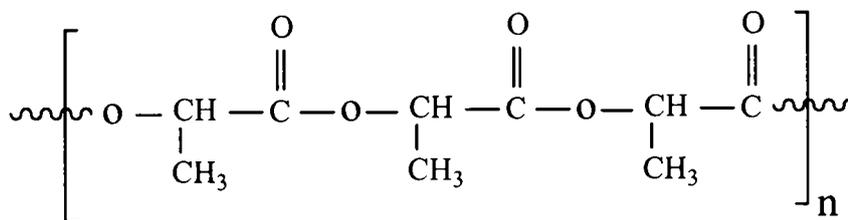
Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con una micropartícula, de aquí en adelante micropartícula [I] de la invención, que comprende (i) un primer polímero biodegradable de tipo PLGA [ácido poli(láctico-glicólico)] y (ii) un segundo polímero de alginato ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular, que encapsula un péptido o proteína inmunológicamente activo/activa.

En la presente invención se entiende por "micropartícula" a aquella partícula que comprende un diámetro inferior a 1 mm, preferentemente, entre 1 y 500 micrómetros. Entre 1 y 0,9, entre 0,9 y 0,8, entre 0,8 y 0,7, entre 0,7 y 0,6, entre 0,6 y 0,5, entre 0,5 y 0,4, entre 0,4 y 0,3, entre 0,3 y 0,2, entre 0,2 y 0,1 o menos de 0,1 mm de diámetro.

El tamaño medio de las micropartículas se ve influenciado principalmente por diferentes factores tecnológicos del procedimiento de producción de dichas micropartículas, tales como la concentración del polímero biodegradable, concentración del agente tensioactivo presente en la fase externa de la doble emulsión y velocidad de agitación.

El primer polímero que forma parte de la micropartícula [I] de la invención es un polímero biodegradable de tipo PLGA. En la presente invención, se entiende por "polímero biodegradable" a polímeros que se disuelven o degradan en un periodo de tiempo que es aceptable para la aplicación deseada, en este caso terapia *in vivo*, una vez que se exponen a una solución fisiológica de pH comprendido entre 4 y 9, a una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C.

Entre este tipo de polímeros se encuentra el ácido poli(láctico-glicólico) o PLGA, un polímero formado a partir de ácido láctico y ácido glicólico con la fórmula estructural



Acido poli(láctico-glicólico)

El PLGA puede presentar diferente proporción de ácido láctico y ácido glicólico. Así, los PLGAs que pueden utilizarse en la presente invención incluyen preferentemente el PLGA 50:50 (50% ácido láctico: 50% ácido glicólico), PLGA 75:25 (75% ácido láctico: 25% ácido glicólico) o combinaciones de ambos.

El segundo polímero que forma parte de la micropartícula [I] de la invención es un polímero de alginato ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular. En principio, cualquier alginato capaz de formar

un hidrogel es adecuado para ser usado en las micropartículas de la invención. Así, las micropartículas [I] de la invención pueden contener alginato formado mayoritariamente por regiones de ácido manurónico (bloques MM), por regiones de ácido gulurónico (bloques GG) y por regiones de secuencia mixta (bloques MG). El porcentaje y distribución de los ácidos urónicos difieren según el origen del alginato y contribuyen a las propiedades del alginato tales como su viscosidad. El experto en la materia conoce los porcentajes de cada uno de los distintos bloques que aparecen en las distintas fuentes biológicas de los alginatos. Así, la invención contempla el uso de alginatos procedentes de *Laminaria hyperborea*, *Letonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Durvillaea antarctica*, *Laminaria digitata*, *Eclonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* y/o *Laminaria japonica* así como mezclas de alginatos de distintas especies hasta conseguir el contenido deseado en bloques GG, MM o GM. Mediante el uso de una combinación adecuada de polímeros de alginato, se puede obtener una mezcla cuyo módulo de elasticidad presenta un valor adecuado mientras que la viscosidad de la solución pre-gel se mantiene a niveles suficientemente bajos como para permitir la adecuada encapsulación/liberación del péptido o la proteína inmunológicamente activo/activa. Así, los alginatos que pueden usarse en la presente invención incluyen alginatos GG, alginatos MM o combinaciones de ambos en una relación de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 o 10:90. Los resultados que se muestran en la presente invención se han obtenido con alginato de viscosidad media que posee más de un 60% de bloques G.

La invención también contempla el uso de alginatos derivados del tratamiento de alginatos naturales con enzimas que son capaces de modificar los bloques integrantes para dar lugar a alginatos con propiedades mejoradas. Así, alginatos resultantes del tratamiento de alginatos con C5-epimerasas, que convierten bloques M en bloques G, así como con la enzima AlgE4 de la bacteria *Azotobacter vinelandii* que es capaz de convertir los bloques M relativamente rígidos en bloques MG. Alternativamente, la invención contempla el uso de alginatos que han sido modificados por distintos tratamientos físicos, en particular, rayos gamma, irradiación con ultrasonidos o con luz ultravioleta según ha sido descrito por Wasikiewicz *et al.* (Rad. Phys. Chem. 2005, 73:287-295).

Adicionalmente, el alginato que forma parte de la micropartícula [I] de la invención está ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular. En la presente invención, se entiende por “ligando específico para un receptor de superficie celular” a la molécula o péptido que es capaz de reconocer un receptor de la superficie celular y unirse a él de forma específica. Este ligando permite que la micropartícula [I] de la invención sea reconocida por los receptores de la superficie de células concretas, por lo que puede unirse a las mismas e interactuar con ellas. En principio, cualquier péptido que posea sitios de unión específicos que puedan ser reconocidos por receptores de superficie de las células puede ser usado en la presente invención. Así, el ligando específico para un receptor de superficie celular puede proceder de moléculas de adhesión celular que interactúan con la matriz extracelular como la fibronectina, los distintos miembros de las familias de las selectinas, las caderinas, las lectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas, las colectinas y las galectinas.

Así, el ligando específico para un receptor de superficie celular empleado en la presente invención puede ser un péptido derivado de una región seleccionada de las regiones de la fibronectina que intervienen en la unión con las integrinas que se encuentran en la membrana celular. Por ejemplo, y sin limitar la invención, dichos péptidos derivan de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina que contiene el péptido RGD, de la región de la decimocuarta repetición tipo III de la fibronectina que contiene el péptido IDAPS, de la región CSI de fibronectina que contiene el péptido LDV y la región CS5 de la fibrinectina que contiene el péptido REDV. Estos péptidos pueden consistir en fragmentos de las regiones correspondientes que conservan su capacidad adhesiva, como, por ejemplo, el péptido QAGDV del fibrinógeno, el péptido LDV de la fibronectina y el péptido IDSP de VCAM-I.

La presente invención también contempla el uso de péptidos de unión a integrinas como un ligando específico para un receptor de superficie celular, que derivan de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina que comprende la secuencia RGD, como, por ejemplo, un péptido seleccionado del grupo de RGD, RGDS, GRGD, RGDV, RGDT, GRGDG, GRGDS, GRGDY, GRGDF, YRGDS, YRGDDG, GRGDSP, GRGDSPG, GRGDSP, GRGDSPG, GRGDSPK, CGRGDSPK, CGRGDSPK, CGRGDSY, ciclo(RGDfK), YAVTGRGD, AcCGNGEPRGDYRAY-NH₂, AcGCGY GRGDSPG y RGDPASSKP, variantes cíclicas de dichos péptidos, variantes multivalentes tanto lineales como ramificadas (ver por ejemplo Dettin *et al.* 2002, J. Biomed. Mater. Res. 60:466-471; Monaghan *et al.* 2001, Arkivoc, 2: U42-49; Thumshirn *et al.* 2003, Chemistry 9: 2717-2725; Scott *et al.*, 2001, J. Gene Med. 3: 125-134) así como combinaciones de dos o más de dichos péptidos.

Por tanto, en otra realización todavía más particular de la micropartícula [I] de la invención, el ligando específico para un receptor de superficie celular es un péptido comprende la secuencia RGD.

Asimismo, el ligando específico para un receptor de superficie celular puede estar ligado al polímero de alginato con distintos grados de sustitución, de forma que las concentraciones de ambos componentes pueden variar y de este modo controlar el número de ligandos específicos para un receptor de superficie celular que están ligados al polímero de alginato. Así, la invención contempla alginatos que contienen entre 1 y 100, entre 100 y 200, entre 200 y 300, entre 300 y 400, entre 400 y 500, entre 500 y 600, entre 600 y 700, entre 700 y 800, entre 800 y 900 y entre 900 y 1000 moléculas de dicho ligando específico por cada molécula de polímero.

Tal como se ha citado anteriormente, la micropartícula [I] de la invención puede encapsular un péptido o proteína inmunológicamente activo/activa. En la presente invención, se entiende por “péptido o proteína inmunológicamente activo/activa” a aquel péptido o proteína que estimula la respuesta inmune (respuesta humoral, celular o ambas) cuando

ES 2 358 703 A1

se introduce en un organismo distinto del organismo de donde procede dicho péptido o proteína. De forma genérica, a dicho péptido o proteína inmunológicamente activo/activa se le denomina antígeno.

5 Por tanto, en la presente invención, el término antígeno se refiere a cualquier sustancia capaz de ser reconocida por el sistema inmune de un sujeto y/o capaz de inducir en un sujeto una respuesta inmune humoral o una respuesta inmune celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T cuando se introduce en un sujeto; a modo ilustrativo, dicho término incluye cualquier producto inmunogénico, nativo o recombinante, obtenido de un organismo superior o de un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito, un protozoo, un hongo, etc., que contiene uno o más determinantes antigénicos, por ejemplo, componentes estructurales de dichos organismos; toxinas, por ejemplo, exotoxinas, etc. Prácticamente cualquier antígeno puede ser utilizado en la elaboración de micropartículas de la invención cargadas con antígeno.

15 Ejemplos de péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas, sin que sirvan para limitar la invención, incluyen:

20 ■ *Péptidos o proteínas capaces de (apropiados o diseñados para) inducir una respuesta inmune frente a una enfermedad infecciosa*, tal como una enfermedad infecciosa en animales causada por microorganismos patógenos de animales, incluyendo al ser humano, por ejemplo, virus, bacterias, hongos y parásitos infecciosos, relevantes en sanidad humana o animal.

Las proteínas o péptidos capaces de inducir una respuesta inmune pueden ser proteínas o péptidos recombinantes, idénticos o similares a los antígenos naturales de un microorganismo específico.

25 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de virus infecciosos incluyen virus de las familias: Arteriviridae, Retroviridae, Picornaviridae, Calciviridae, Togaviridae, Flaviridae, Coronaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bungaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Hepadnaviridae, Parvoviridae (parvovirus), Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Iridoviridae, etc. Ejemplos de antígenos que se pueden emplear según la presente invención incluyen, aunque no se limita a, antígenos de HIV, antígeno gp120, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígenos de rotavirus como VP4 y VP7, antígenos del virus de la influenza como la hemaglutinina o la nucleoproteína, antígeno del herpes simplex timidina kinasa, etc.

30 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bacterias incluyen tanto bacterias Gram positivas, e.g., *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, etc., como bacterias Gram negativas, e.g., *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, etc. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sp.* (e.g., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de Streptococcus), *Streptococcus (grupo viridans)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (especies anaeróbicas)*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphteriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Actinomyces israelii*, *Chlamydia*, etc.

35 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de hongos infecciosos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis* y *Candida albicans*. Entre los parásitos infecciosos se incluyen, a modo ilustrativo, no limitativo, protozoos, tales como *Plasmodium sp.*, causantes de la malaria, e.g. *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, etc., *Leishmania sp.*, causantes de leishmaniasis, e.g., *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, etc., *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma sp.*, etc., así como nematodos parásitos, tales como *Dirofilaria immitis*, etc. Ejemplos de antígenos para estos parásitos incluyen el antígeno circunsporozoito de *Plasmodium spp.*; el antígeno de superficie merozoito de *Plasmodium spp.*; el antígeno SPf66 de *P. falciparum*; el antígeno S-3, molécula que incluye cuatro epitopos correspondientes a diferentes estadios del ciclo de vida de *P. falciparum*; el gp63 de *Leishmania spp.*, etc.

45 ■ *Péptidos o proteínas asociados a tumores o cánceres (“marcadores tumorales”)* capaces de (apropiados o diseñados para) inducir una respuesta inmune frente a una célula tumoral o cancerosa, por lo que el péptido o proteína puede ser utilizado en el tratamiento de cánceres mediante la estimulación de una respuesta inmune específica de antígeno frente a un antígeno tumoral.

50 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de cánceres que podrían ser potencialmente tratados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen cáncer del tracto biliar, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de estómago, neoplasmas intraepiteliales, linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (e.g., cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas), melanoma, neuroblastomas, cáncer de boca, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de recto, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

La selección de antígenos tumorales o determinantes antigénicos para el tratamiento de cánceres puede ser realizada por un experto en la materia a la vista del estado de la técnica (Renkvist *et al.* 2001, Cáncer Immunol. Immunother. 50: 3-15), estando dichos antígenos y determinantes antigénicos incluidos dentro del ámbito de la presente invención. Ejemplos representativos de dichos antígenos o determinantes antigénicos incluyen: Her2 (cáncer de mama); GD2 (neuroblastoma); EGF-R (glioblastoma maligno); CEA (cáncer de tiroides medular); CD52 (leucemia); proteína gp100 de melanoma humano; proteína melan-A/MART-1 de melanoma humano; tirosinasa; proteína NA17-A nt; proteína MAGE-3; proteína p53; proteína HPV16E7; y fragmentos antigénicos de dichos péptidos o proteínas.

■ *Péptidos o proteínas capaces de (apropiados o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a un alérgeno.*

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “alérgeno” se refiere a un péptido o proteína a la que un sujeto es sensible y provoca una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos alérgenos de pólenes, extractos alérgenos de insectos, extractos alérgenos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de alérgenos incluyen extractos proteicos de pólenes, e.g., de *Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*, *Olea europea*, *Platanus sp.*, *Cupressus sp.*, etc.; extractos proteicos de insectos, e.g., de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, etc.; extractos proteicos de hongos o de epitelios animales, e.g., *Penicillium sp.*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, epitelio de perro, epitelio de gato, epitelio de caballo, etc.; extractos proteicos de alimentos o productos alimenticios, etc.

■ *Péptidos o proteínas capaces de (apropiados o diseñados para) inducir una respuesta mejorada frente a un auto-antígeno.* El término “auto-antígeno”, tal como aquí se utiliza, se refiere a péptidos o proteínas codificados por el ADN del sujeto y productos generados por proteínas o ARN codificado por el ADN del sujeto. Ejemplos de auto-antígenos se describen en WO 02/56905.

Gracias a las características técnicas de la micropartícula [I] de la invención y explicadas al comienzo de la presente descripción, ésta es adecuada para la liberación en el organismo de péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas y estimular con ello la respuesta inmune del organismo frente a dichos péptidos y proteínas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con la micropartícula [I] de la invención para su uso como vacuna.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la micropartícula [I] de la invención en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un individuo.

En la presente invención se entiende por “individuo” o “sujeto” a un miembro de una especie de animal, preferentemente mamífero e incluye, pero no se limita a, un animal doméstico, un primate y un humano; en el contexto de la presente invención, el individuo es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier raza o edad.

Debido a la capacidad de la micropartícula de la invención de liberar los péptidos y proteínas encapsuladas en su interior, la micropartícula resulta de gran utilidad como dispositivo para la liberación de compuestos de naturaleza peptídica con actividad biológica. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la micropartícula [I] de la invención para la liberación de péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas.

La liberación de los péptidos y proteínas puede hacerse de forma controlada mediante una adecuada selección de la proporción de monómeros (ácido láctico y ácido glicólico) que forman el PLGA utilizado en la elaboración de la micropartícula. La velocidad de degradación de estos polímeros depende fundamentalmente de la proporción de ambos monómeros. De este modo, mediante una adecuada selección de dicha composición es posible conseguir que la degradación tenga lugar durante periodos de tiempo que pueden comprender desde unos pocos días hasta varios meses. El peso molecular del polímero también influye en la velocidad de degradación, ya que cuanto menor sea el peso molecular menor será el tiempo necesario para la obtención de pequeños oligómeros o monómeros hidrofílicos (Lewis, *et al.* Controlled release of bioactive agents from lactide/glicolide polyesters. En: Chasin, M. *et al.* Biodegradable polymers as drug delivery systems. Ed. Marcel Decker, Inc. New York, 1990).

La micropartícula [I] de la invención puede administrarse al individuo por sí sola o formando parte de composiciones farmacéuticas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, junto a la administración simultánea o separada de un agente terapéutico. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, de aquí en adelante, composición farmacéutica [I] de la invención, que comprende la micropartícula [I] de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables empleados en la elaboración de composiciones farmacéuticas, pueden encontrarse en el libro “Rowe, R., Sheskey, P. y Owen, S. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5ª Ed. APhA y Pharmaceutical Press. Londres, 2004”.

Las micropartículas [I] de la invención, tras su administración a un sujeto, son capaces de liberar el péptido o proteína inmunológicamente activo/activa de manera estable y gradual durante tiempos prolongados, de forma que

ES 2 358 703 A1

actúan como medicamentos de liberación sostenida. Por ello, la micropartícula [I] de la invención permite evitar la administración continua y repetida de agente terapéutico en aquellos pacientes que requieran niveles basales de dicho agente durante un tiempo prolongado.

5 La micropartícula [I] de la invención o la composición farmacéutica [I] de la invención pueden ser administradas al paciente de forma parenteral, incluyendo intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, etc. y no parenteral, por ejemplo, tópica, a través de las mucosas, es decir, oral, bucal, sublingual, nasal (por inhalación), vaginal, etc., y se formularán en una forma farmacéutica apropiada a la vía de administración elegida, por ejemplo, en forma de soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en una forma farmacéutica unitaria apropiada. Pueden
10 usarse excipientes adecuados, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, conservantes, etc. Información sobre dichos excipientes y formas farmacéuticas de administración de la micropartícula [I] de la invención o la composición farmacéutica [I] de la invención, puede encontrarse en el libro "Rowe, R, Sheskey, P. y Owen, S. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5ª Ed. APhA y Pharmaceutical Press. Londres, 2004", citado *at supra*.

15 La dosis de micropartículas [I] de la invención a administrar a un individuo puede variar de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y 100 mg por Kg de peso corporal.

La producción de dichas formas farmacéuticas de administración por cualquiera de las vías elegidas puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. A modo ilustrativo, información
20 sobre los procedimientos para la producción de dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de la invención puede encontrarse en el libro "Swarbrick, J., Boylan, J.C. Encyclopedia of Pharmaceutical technology. 2ª Ed. Marcel Dekker Inc. New York, 2002-2004".

25 En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende la micropartícula [I] de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente terapéutico.

El término "agente terapéutico" incluye cualquier compuesto que puede usarse para tratar, prevenir o curar las enfermedades en un sujeto o aquel utilizado para mejorar el bienestar físico y mental en humanos y animales. "Agentes terapéuticos" incluyen, pero no se limitan a, un agente quimioterápico, alérgenos, analgésicos, antitumorales, un esteroide, un retinoide, un compuesto antibiótico (antimicrobiano, antiviral o antifúngico), un antioxidante, un compuesto antiinflamatorio, neuroprotector, antiasmático, surfactantes pulmonares, análogos de vitaminas, ácido salicílico, etc. Un agente terapéutico incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y derivados farmacéuticos de los mismos.

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con la composición farmacéutica [I] de la invención para su uso como vacuna.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición farmacéutica [I] de la invención en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo.

40 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición farmacéutica [I] de la invención como sistema de liberación de péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas.

Como entiende el experto en la materia, la micropartícula [I] de la invención puede estar contenida en un kit que, opcionalmente, puede comprender un agente terapéutico tal como se ha definido anteriormente.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante kit [I] de la invención, que comprende la micropartícula [I] de la invención y que, en una realización particular, comprende, además, un agente terapéutico.

50 En la presente invención se entiende por "kit", un producto que contiene las micropartículas [I] de la invención o los distintos componentes de la composición farmacéutica [I] de la invención empaquetados para permitir su transporte, almacenamiento y su administración de forma simultánea o secuencial. Así, los kits de la invención pueden contener una o más suspensiones, comprimidos, cápsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares que contienen las micropartículas [I] de la invención o los distintos componentes de la composición farmacéutica [I] de la invención, y que se pueden encontrar preparadas en una dosis única o como múltiples dosis. Adicionalmente, el kit puede contener un vehículo adecuado para la resuspensión de las micropartículas [I] de la invención o los distintos componentes de la composición farmacéutica [I] de la invención, tales como medios acuosos, e.g. solución salina, solución Ringer, solución Ringer lactato, dextrosa y cloruro sódico, medios solubles en agua, tales como alcohol, polietilenglicol, propil etilenglicol y vehículos insolubles en agua como aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato bencílico. Otro componente que puede estar presente en el kit es un empaquetamiento que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de unos límites determinados. Materiales adecuados para la preparación de tales empaquetamientos incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares.

65 Los usos del kit [I] de la invención constituyen aspectos inventivos adicionales. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el kit [I] de la invención para su uso como vacuna.

ES 2 358 703 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el kit [I] de la invención en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un individuo.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit [I] de la invención como sistema de liberación de péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas.

En general, las micropartículas pueden obtenerse a partir de polímeros biodegradables que, en el caso de la presente invención son PLGA y alginato, mediante un procedimiento que comprende la disolución de dichos polímeros en un disolvente adecuado (e.g., diclorometano, acetato de etilo, acetona, agua etc.) y posterior emulsificación con una fase acuosa. A continuación esta primera emulsión se adiciona sobre una solución de un agente tensioactivo (e.g. alcohol polivinílico) para formar una doble emulsión. Finalmente se procede a la desolvatación o extracción del sol-
10 vente en el que estaba solubilizado el PLGA tras la adición de un disolvente apropiado, por ejemplo, un disolvente o una mezcla de disolventes miscible con la disolución del polímero biodegradable, tal como una mezcla isopropanol-agua, obteniéndose una suspensión acuosa de micropartículas de la que se aíslan la micropartículas por métodos
15 convencionales, por ejemplo, mediante filtración a vacío o centrifugación. La relación, en volumen, fase orgánica: solución hidroalcohólica (isopropanol/agua) puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 1:10 y 1:100 (v:v).

La proporción del péptido o proteína inmunológicamente activo/activa incorporada en la micropartícula de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 25% en peso respecto al peso total de las micropartículas. No obstante, la proporción adecuada dependerá en cada caso del péptido o proteína
20 incorporada.

La incorporación del péptido o proteína inmunológicamente activo/activa a las micropartículas de la invención se puede hacer tal como se describe en WO 02/069938, por incorporación a la solución del polímero biodegradable (en la fase interna de la primera emulsión) antes de la formación de micropartículas, o bien posteriormente adicionarla a la suspensión acuosa de las micropartículas ya formadas.

Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de la micropartícula [I] de la invención, que comprende las etapas de
30

- a. preparar una disolución de PLGA en un disolvente orgánico,
- b. preparar una disolución acuosa de alginato ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular,
35
- c. emulsificar las disoluciones con el péptido o la proteína inmunológicamente activo/activa,
- d. adicionar la emulsión obtenida en el apartado c) sobre una solución que contiene cloruro cálcico y
40
- e. aislar las micropartículas.

En una realización preferida del procedimiento para la preparación de la micropartícula [i] de la invención, la emulsión obtenida en el apartado c) se puede adicionar sobre una solución de un agente tensioactivo (e.g. alcohol polivinílico) para obtener una doble emulsión y seguidamente, adicionar dicha doble emulsión sobre una solución hidroalcohólica que contiene cloruro cálcico para asegurar la total gelificación del alginato.
45

Como entiende el experto en la materia, dicho procedimiento puede comprender etapas adicionales que suponen realizaciones preferidas del procedimiento, como por ejemplo, una etapa de evaporación/extracción del disolvente para obtener las micropartículas de PLGA-alginato que contienen dichos péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas, seguido de una etapa de aislamiento de las micropartículas y, opcionalmente, liofilizar o desecar las micropartículas obtenidas.
50

Las micropartículas [I] de la invención pueden purificarse o aislarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial, filtración a vacío, o evaporación, incluyendo la utilización de vacío.
55

En una realización particular del procedimiento para la preparación de la micropartícula [II] de la invención, el ligando específico para un receptor de superficie celular es un péptido comprende la secuencia RGD.
60

Asimismo, si se desea, las micropartículas [I] de la invención pueden ser liofilizadas por métodos convencionales. Desde un punto de vista farmacológico, es importante poder disponer de micropartículas en forma liofilizada dado que ello mejora su estabilidad durante el almacenamiento y conservación a largo plazo, además de reducir el volumen del producto que va a ser manipulado. Las micropartículas [I] de la invención pueden ser liofilizadas en presencia de un agente crioprotector habitual tal como glucosa, sacarosa, manitol, trehalosa, glicerol, lactosa, sorbitol, polivinilpirrolidona, etc., preferentemente, sacarosa o manitol; a una concentración comprendida dentro de un amplio intervalo, preferentemente, entre 0,1% y 20% en peso.
65

Opcionalmente, se puede añadir un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las micropartículas [I] de la invención, tal como se describe en WO 02/069938. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes reticulantes que se pueden utilizar incluyen compuestos diaminados, por ejemplo 1,3 diaminopropano, polisacáridos o sacáridos simples, proteínas y, en general, cualquier molécula que presente grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos funcionales presentes en el polímero biodegradable.

Adicionalmente, la invención también se relaciona con un procedimiento para la preparación de una micropartícula en la que el alginato no está ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular pero que, debido a las características del alginato en combinación con el PLGA, conserva las propiedades de la micropartícula [I] de la invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de una micropartícula, de aquí en adelante, micropartícula [II] de la invención, que comprende las etapas de

- a. preparar una disolución de PLGA en un disolvente orgánico,
- b. preparar una disolución acuosa de alginato,
- c. emulsificar las disoluciones con el péptido o la proteína inmunológicamente activo/activa,
- d. adicionar la emulsión obtenida en el apartado c) sobre una solución que contiene cloruro cálcico y
- e. aislar las micropartículas.

En una realización preferida del procedimiento para la preparación de la micropartícula [II] de la invención, la emulsión obtenida en el apartado c) se puede adicionar sobre una solución de un agente tensioactivo (e.g. alcohol polivinílico) para obtener una doble emulsión y seguidamente, adicionar dicha doble emulsión sobre una solución hidroalcohólica que contiene cloruro cálcico para asegurar la total gelificación del alginato.

Como entiende el experto en la materia, dicho procedimiento puede comprender etapas adicionales que suponen realizaciones preferidas del procedimiento, como por ejemplo, una etapa de evaporación/extracción del disolvente para obtener las micropartículas de PLGA-alginato que contienen dichos péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas, seguido de una etapa de aislamiento de las micropartículas y, opcionalmente, liofilizar o desecar las micropartículas obtenidas.

Tal como se ha citado anteriormente, las micropartículas [II] de la invención pueden purificarse o aislarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial, filtración a vacío, o evaporación, incluyendo la utilización de vacío.

En una realización particular, el alginato ligado o no a un ligando específico puede incluirse en la fase externa de la doble emulsión y el resto del procedimiento de elaboración sería igual al descrito anteriormente.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con una micropartícula obtenible por un procedimiento según se ha descrito anteriormente, en donde el alginato de la micropartícula resultante que no está ligado a un ligando específico para un receptor de superficie celular, es decir, una micropartícula, de aquí en adelante micropartícula [II] de la invención, que comprende (i) un primer polímero biodegradable de tipo PLGA [ácido poli(láctico-glicólico)] y (ii) un segundo polímero de alginato, que encapsula un péptido o proteína inmunológicamente activo/activa.

Los diferentes usos de la micropartícula [II] de la invención constituyen aspectos inventivos adicionales.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con la micropartícula [II] de la invención para su uso como vacuna.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la micropartícula [II] de la invención en elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un individuo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la micropartícula [II] de la invención como sistema de liberación de péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende la micropartícula [II] de la invención, de aquí en adelante, composición farmacéutica [II] de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular, la composición farmacéutica [II] de la invención comprende, además, un agente terapéutico.

En otro aspecto, la invención se relaciona con la composición farmacéutica [II] de la invención para su uso como vacuna.

ES 2 358 703 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición farmacéutica [III] de la invención en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición farmacéutica [II] de la invención como sistema de liberación de proteínas o péptidos inmunológicamente activos/activas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante, kit [III] de la invención, que comprende la micropartícula [II] de la invención.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el kit [III] de la invención para su uso como vacuna.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit [III] de la invención en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un individuo.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit [III] de la invención en la liberación de péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas.

En un último aspecto, la invención se relaciona con el uso del alginato como adyuvante de un péptido o proteína inmunológicamente activo/activa.

20 La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

25 Ejemplo 1

I. *Elaboración de las micropartículas de la invención*

30 Para la elaboración de las micropartículas se utilizaron el PLGA 50:50, comercializados por Boehringer Ingelheim G.K., Ingelheim, Germany. El alginato utilizado era un alginato MVG (de viscosidad media, rico en bloques G) de NovaMatrix, FMC Biopolymers Philadelphia, PA, USA y el alginato RGD fue obtenido mediante modificación del alginato MVG siguiendo el procedimiento descrito por Rowley *et al* 1999. *Biomaterials* 20: 45-53.

35 Los péptidos SPf66 y S3, se obtuvieron mediante síntesis en fase sólida siguiendo la metodología descrita por Merrifield (Merrifield, B. *Solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of Thetrapeptide. J. Am. Chem. Soc.* 2149-2154. 1963) y modificada por Houghten (Houghten R. *General method for the rapid solid-phase synthesis of large number of peptides. Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc. Nat. Acad. Sci.* 82: 5131-5135. 1985.), bajo condiciones de Normas de Correcta Fabricación (GMP) en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. La secuencia de aminoácidos del péptido SPf66, en código de una letra, es la siguiente: CGDELEAETQNVYAAPNANPYSLFQKEKMVLPNANPPANKKNAGC (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos del péptido S3, es la siguiente: DELEAETQNVYAAPNANPYSLFQKEKMVLPNANPPANKKNA (SEQ ID NO: 2).

45 El resto de reactivos son de grado analítico y se obtienen a través de distribuidores habituales de productos químicos.

Las micropartículas (MP) se elaboraron mediante la técnica de doble emulsión evaporación/extracción del solvente. Para cada antígeno se prepararon 3 formulaciones de MP diferentes: MP de PLGA (PLGA MP), MP de PLGA y alginato al 2%(w/w) (PLGA-alg MP), y MP de PLGA y 2% de alginato ligado con RGD (PLGA-alg RGD MP).

50 ■ *Preparación de las MP de PLGA*

Una solución acuosa del péptido al 10% (w/v) se adicionó sobre otra de diclorometano con el polímero PLGA al 5% (w/v) emulsionándolas mediante sonicación durante 30 s a 50 W (Branson® sonifier 250). Esta emulsión w/o se vertió sobre una solución acuosa de alcohol polivinílico al 8% (w/v) homogenizándolas durante 5 minutos a 8.000 rpm para favorecer la formación de una segunda emulsión w/o/w mediante homogenizador de turbina (Ultaturax® T-25). A continuación la doble emulsión se adicionó sobre otra solución acuosa de isopropanol al 2% (v/v) y se dejó agitando con un agitador de paletas (HEIDOLPH. Mod.RZR1) para favorecer la evaporación/extracción del solvente orgánico e inducir así la formación de las micropartículas. Al cabo de 1 hora, se recogieron las MP mediante centrifugación 60 10.000 rpm y se lavaron 3 veces con agua destilada mediante centrifugación y resuspensión sucesiva. Finalmente las micropartículas de PLGA (PLGA MP) se resuspendieron en agua milliQ y se liofilizaron.

■ *Preparación de las MP de PLGA-alginato*

65 La preparación de las MP de alginato (PLGA-alg MP) se llevó a cabo de una forma similar a las de PLGA pero con ciertas modificaciones. Para la formación de la primera emulsión w/o, la fase acuosa, además del péptido al 10%, también contenía el alginato en una proporción 2% (w/w) respecto del PLGA. Esta primera emulsión se formó mediante sonicación, así como la segunda mediante un homogenizador de turbina. Una vez que se obtuvo la w/o/w,

ES 2 358 703 A1

ésta se adicionó sobre isopropanol 2% y CaCl₂ 0,6 mM para asegurar la total gelificación del alginato a la vez que se evapora el diclorometano. Los siguientes pasos son igual que para la anterior formulación.

■ Preparación de las MP de PLGA-alginatoRGD

En cuanto a las micropartículas de PLGA-alginato ligado a un péptido RGD (PLGA-algRGD MP), éstas se elaboraron exactamente igual que PLGA-alg MP pero utilizando un alginato que ha sido unido o ligado con RGD (alg RGD).

II. Caracterización de las micropartículas

Una vez elaboradas las micropartículas se procedió a su completa caracterización mediante la determinación de su morfología, tamaño, potencial Z, porcentaje de péptido encapsulado y adsorbido a la superficie y perfil de liberación *in vitro*.

La caracterización morfológica se realizó empleando la técnica de microscopía electrónica de barrido (Jeol JSM-35 CF). El tamaño de partícula se determinó mediante la técnica de difracción de rayos láser utilizando un analizador de partículas COULTER® COUNTER LS 130. Para determinar el porcentaje de péptido encapsulado (p/p) se utilizó el ensayo de Lowry modificado conocido como método del ácido bicinónico (micro-BCA) (Smith *et al.* 1985, Anal. Biochem. 150: 76-85.). El potencial zeta se determinará mediante velocimetría láser doppler (Malvern® Zetasizer 3000). El péptido total encapsulado se determinó tras la digestión completa de las microesferas con una solución de NaOH 0.2 M. El péptido adsorbido o asociado a la superficie de las micropartículas, se determinó resuspendiendo las micropartículas, en una solución tampón fosfato 20 mM, pH 7,4 e incubando a 37°C, bajo agitación orbital continua durante 30 min. Las microesferas fueron posteriormente sedimentadas por centrifugación y en el sobrenadante se analizó el contenido de SPf66 mediante la técnica de micro-BCA. El péptido asociado a la superficie corresponde al porcentaje del péptido total encapsulado que está presente en la superficie de las micropartículas y consecuentemente disponible para una liberación rápida.

El análisis de las micropartículas mediante microscopía electrónica de barrido permitió observar sus características morfológicas, siendo partículas esféricas de superficie lisa (figura 1).

Los diferentes parámetros caracterizados en las micropartículas se encuentran recogidos en la Tabla 1. Tal y como puede observarse en la tabla, los diferentes tipos de MP elaboradas presentaron un tamaño de partícula medio en torno a 1 micrómetro. Sin embargo, la carga superficial neta de las micropartículas se ve influenciada por la presencia de alginato, ya que se observaron notables diferencias en los potenciales Zeta de las MP dependiendo de la presencia o no de alginato en la formulación. Para ambos péptidos (SPf66 y S-3), las MP con alginato presentaron valores de potencial zeta más negativos que sus respectivas PLGA MP. Estos resultados ponen de manifiesto que el alginato (polianión) se incorpora a la micropartículas, y al menos en parte lo hace a nivel superficial, a que el alginato es un polianión. Respecto a la eficiencia de encapsulación (EE) y péptido adsorbido a la superficie (SAP), se observa un incremento de la EE al introducir el alginato mientras que la SAP se redujo notablemente, con respecto a las micropartículas preparadas únicamente con PLGA (PLGA MP). La inclusión de alginato en la fase acuosa interna de la doble emulsión, junto con el péptido, permite aumentar la viscosidad de la primera emulsión dificultando la difusión del péptido hacia la fase externa acuosa, lo cual, junto la posibilidad de gelificar el alginato por entrecruzamiento con el cloruro cálcico, evita la pérdida del péptido durante la fase de formación de las micropartículas.

TABLA 1

Formulación	Eficiencia de encapsulación	Péptido adsorbido a superficie (%)	Carga (µg/mg MP)	Tamaño (µm)	Potencial Zeta (mV)
SPf66 PLGA MP	78,91	17,96	71,74	1,02	-8,0
SPf66 PLGA-alg MP	87,97	5,59	78,54	0,95	-12,5
SPf66 PLGA-alg RGD MP	94,34	4,01	84,24	0,93	-16,7
S-3 PLGA MP	82,72	37,73	75,20	0,82	-9,8
S-3 PLGA-alg	87,07	6,04	77,74	0,89	-11,3

ES 2 358 703 A1

MP					
S-3 PLGA-alg RGD MP	77,74	5,30	69,41	0,90	-18,2

Estudios de liberación in vitro

Con el propósito de obtener el perfil de liberación del péptido a partir de las micropartículas de PLGA, se pesaron exactamente 20 mg de microesferas en tubos de ensayo y se resuspendieron en tampón fosfato 20 mM, pH 7,4 incubándose a 37°C en agitación orbital continua. A intervalos de tiempo preestablecidos, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue extraído y analizado para cuantificar el péptido, mediante la técnica de micro-BCA descrita anteriormente. El sobrenadante retirado es reemplazado con un volumen equivalente de solución tampón fresca para continuar con el ensayo de liberación. El perfil de liberación del péptido obtenido para cada formulación de micropartículas fue expresado en términos de porcentaje acumulado de péptido liberado en función del tiempo. Los ensayos de liberación se realizaron por triplicado para cada una de las formulaciones elaboradas.

Como puede observarse en la figura 2 los perfiles de liberación de los péptidos a partir de las micropartículas presentan un comportamiento trifásico. Solo se encuentran diferencias en la liberación del péptido en los tiempos iniciales (péptido asociado a la superficie), mientras que el resto del perfil obtenido durante los 112 días de duración del ensayo muestra velocidades de liberación muy similares entre las formulaciones de PLGA y las 2 de PLGA-alginato, para cada uno de los péptidos.

III. Estudios de inmunización

La respuesta inmune inducida por las micropartículas se evaluó en ratones Balb/c de 25 g de peso y 6-8 semanas divididos en 6 grupos de 7 ratones. El grupo 1 recibió una dosis intradérmica de 100 µg del antígeno SPf66 microencapsulado en microesferas de PLGA 50:50 (PLGA MP). El grupo 2 recibió la misma dosis del antígeno SPf66 microencapsulado en microesferas de PLGA y alginato al 2% (PLGA-alg MP). El grupo 3 recibió 100 µg del antígeno del antígeno SPf66 microencapsulado en microesferas de PLGA y 2% de alginato ligado con RGD (PLGA-alg RGD MP). Los grupos 4, 5 y 6 recibieron la misma dosis de antígeno S3 microencapsulado en los tres tipos de micropartículas anteriormente descritas, PLGA MP, PLGA-alg MP y PLGA-alg RGD MP, respectivamente.

Determinación de anticuerpos

Todos los animales fueron sangrados del plexo retro-orbital bajo anestesia, antes de la primera inmunización y a intervalos periódicos hasta la semana 12. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 minutos, el suero fue recuperado y almacenado a -80°C para su posterior caracterización inmunológica. Los niveles de anticuerpos anti-péptido IgG total IgG2a e IgG1 se determinaron mediante una técnica de ELISA convencional.

Las Figuras 3 y 4 muestran los niveles de anticuerpos (Ig G totales) obtenidos para los diferentes grupos de animales inmunizados con 100 µg del antígeno SPf66 ó S-3. Tal y como se había observado en estudios previos, las micropartículas de PLGA (PLGA MP) cargadas tanto con SPf66 como con S-3 originaron una alta respuesta humoral administradas por vía intradérmica. Asimismo, cabe destacar que las micropartículas con alginato (PLGA-alg MP) mejoraron significativamente la respuesta para ambos antígenos peptídicos. Por otro lado, la incorporación de las secuencias RGD en el alginato (PLGA-alg RGD MP), se observaron también diferencias entre las partículas formuladas sin alginato (PLGA MP), con el alginato no ligado (PLGA-alg MP) o el algRGD (PLGA-alg RGD MP), sobretodo en los tiempos iniciales, 3 y 6 semanas, donde las PLGA-algRGD MP indujeron títulos de IgG superiores a los de las PLGA-alg MP. Las secuencias RGD inducen un reconocimiento específico por parte de las células presentadoras de antígenos (APCs), pudiendo éstas captar las MP de una forma más eficiente.

La producción de isotipos de anticuerpos (IgG1 e IgG2a) por los ratones inmunizados fue estudiada a las 9 semanas. Todas las formulaciones indujeron niveles elevados y similares de IgG1. En cuanto a la IgG2a, aunque todos los grupos mostraron niveles detectables, se observó diferencias entre las formulaciones administradas. Para ambos péptidos, las MP que incorporan alginato indujeron niveles de IgG2a superiores a los de las PLGA MP. Además, las MP que contenían el alginato modificado con secuencias RGD aumentaron la secreción de este isotipo citofílico (IgG2a para ratones) respecto a las MP del alginato no ligado, siendo dicho incremento mayor para el caso del péptido SPf66 que para el S-3. Esto resulta de gran importancia, ya que en la infección por malaria los anticuerpos citofílicos juegan un papel importante a la hora de generar protección frente al parásito. Tal y como puede observarse en las figuras 5 y 6 la relación IgG2a/IgG1 resultó significativamente superior para las MP con alginato que para las elaboradas únicamente con PLGA, para ambos péptidos. Los ratios más altos corresponden en ambos casos para las formulaciones PLGA-alg RGD MP.

Ensayos de secreción de IFN-γ

La secreción de IFN-γ del cultivo celular de los nódulos linfáticos extraídos de los ratones transcurridas 14 semanas desde la inmunización, fue determinada mediante ELISA de captura (OptEIA IFN-γ ELISA kit (PharMingen, Becton Dickinson, San Diego, CA).

ES 2 358 703 A1

Como muestran las figuras 7 y 8 todos los cultivos celulares de los nódulos linfáticos de los grupos inmunizados con las micropartículas de SPf66 ó S-3 produjeron niveles detectables de la citoquina IFN- γ tras su estimulación *in vitro* con el péptido correspondiente a la inmunización. Los grupos que recibieron las PLGA MP indujeron los menores niveles de IFN- γ , mientras que los más altos fueron conseguidos por las PLGA-*alg* RGD MP y las PLGA-*alg* MP secretaron niveles intermedios a los de las otras 2 formulaciones.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

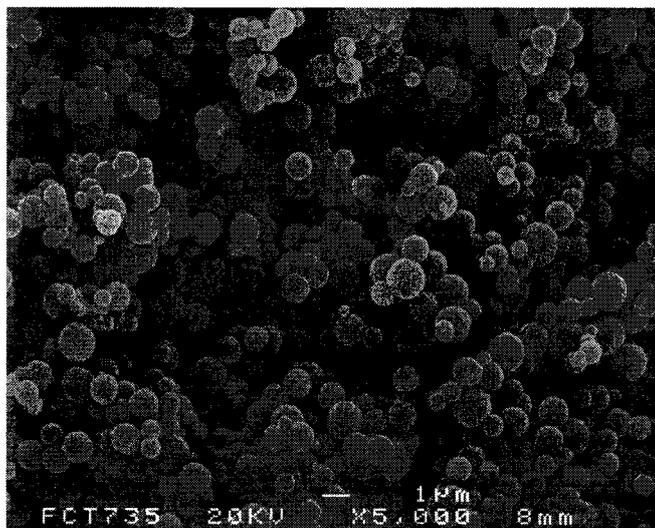
60

65

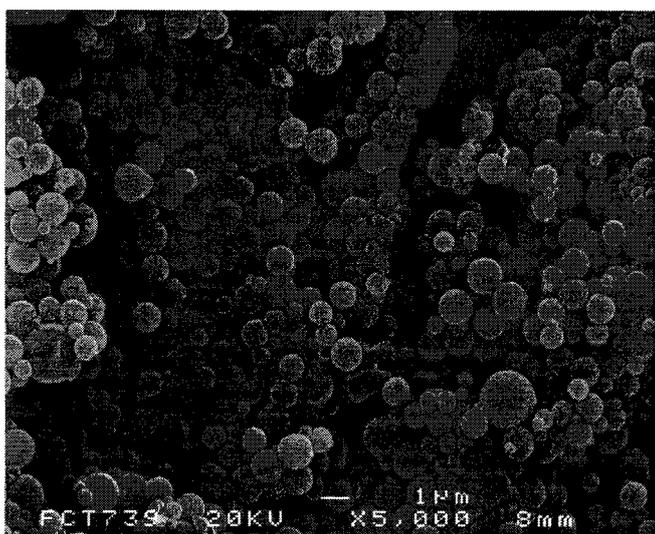
ES 2 358 703 A1

REIVINDICACIONES

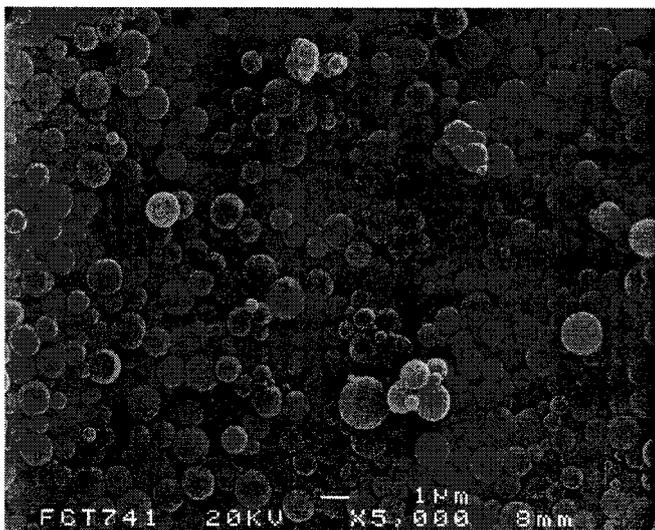
- 5
1. Un procedimiento para la preparación de una micropartícula que comprende las etapas de
- a. preparar una disolución de PLGA en un disolvente orgánico,
- b. preparar una disolución acuosa de alginato,
- 10 c. emulsificar las disoluciones con el péptido o la proteína inmunológicamente activo/activa,
- d. adicionar la emulsión obtenida en el apartado c) sobre una solución que contiene cloruro cálcico y
- e. aislar las micropartículas.
- 15 2. Una micropartícula obtenible por un procedimiento según la reivindicación 1.
3. Una micropartícula según la reivindicación 2 para su uso como vacuna.
- 20 4. Uso de una micropartícula según la reivindicación 2 en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo.
5. Uso de una micropartícula según la reivindicación 2 como sistema de liberación de dichos péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas.
- 25 6. Una composición que comprende una micropartícula según la reivindicación 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición según la reivindicación 6 que comprende, además, un agente terapéutico.
- 30 8. Una composición según la reivindicación 6 ó 7 para su uso como vacuna.
9. Uso de una composición según la reivindicación 6 ó 7 en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo.
- 35 10. Uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 6 ó 7 como sistema de liberación de péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas.
11. Un kit que comprende una micropartícula según la reivindicación 2.
- 40 12. Un kit según la reivindicación 11 para su uso como vacuna.
13. Uso de un kit según la reivindicación 11 en la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un individuo.
- 45 14. Uso de un kit según la reivindicación 11 en la liberación péptidos o proteínas inmunológicamente activos/activas.
- 50
- 55
- 60
- 65



PLGA MP



PLGA-alg MP



PLGA-alg RGD MP

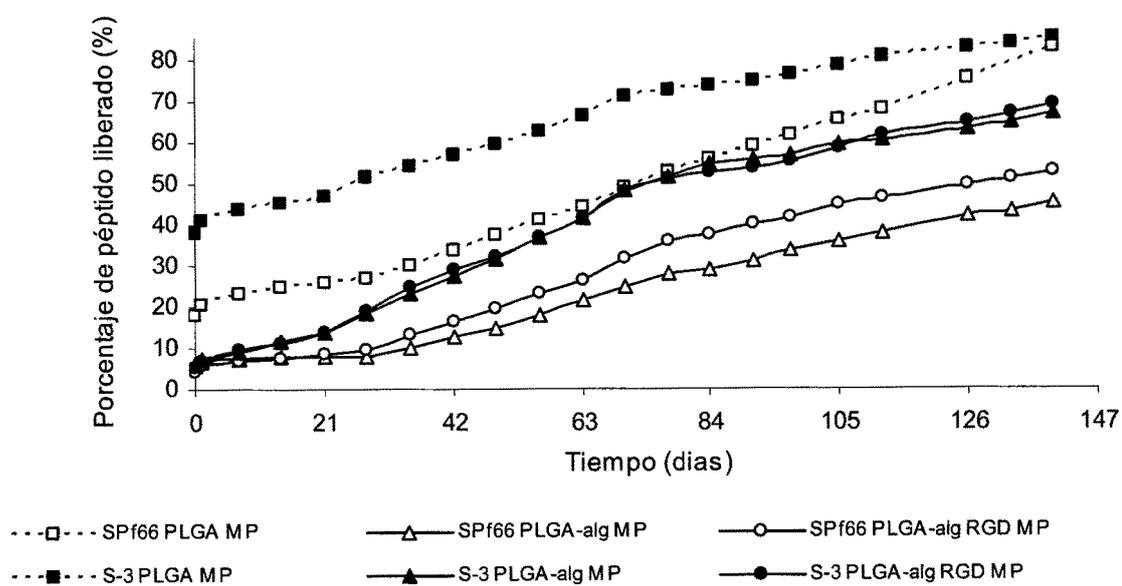
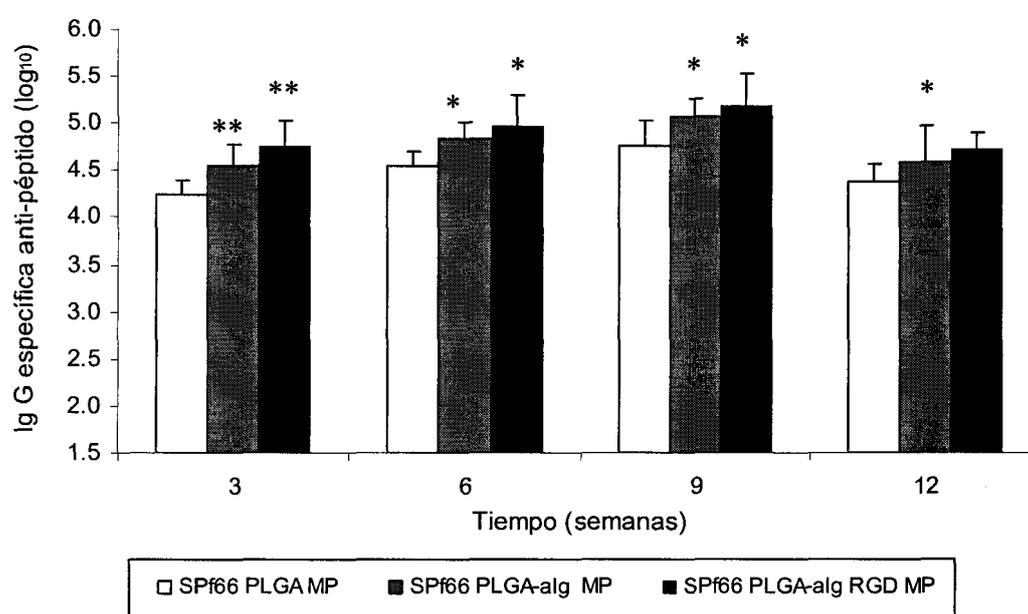
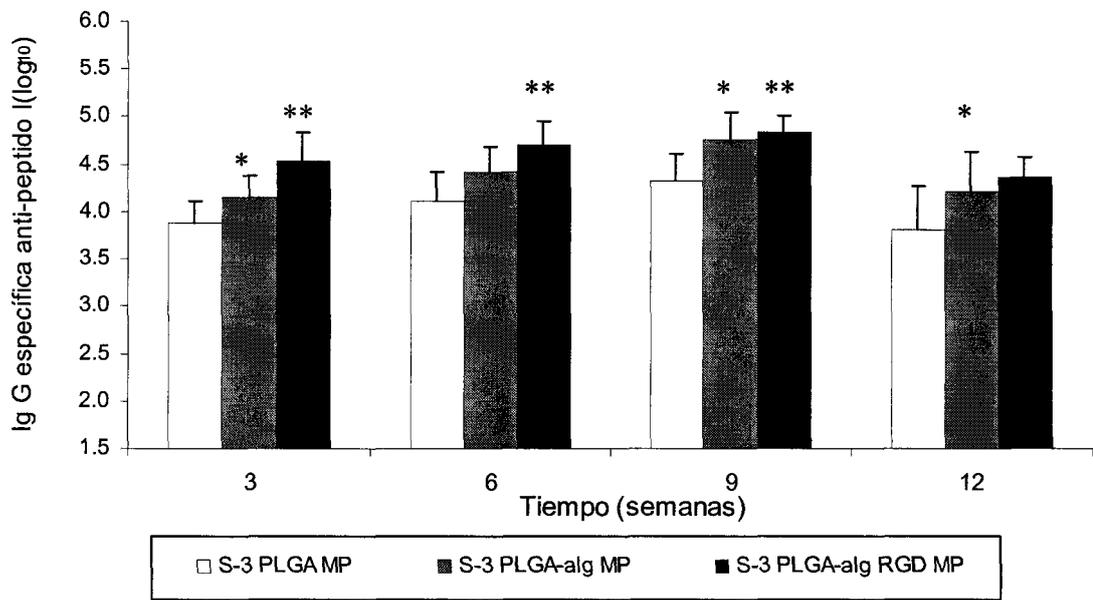


FIGURA 2



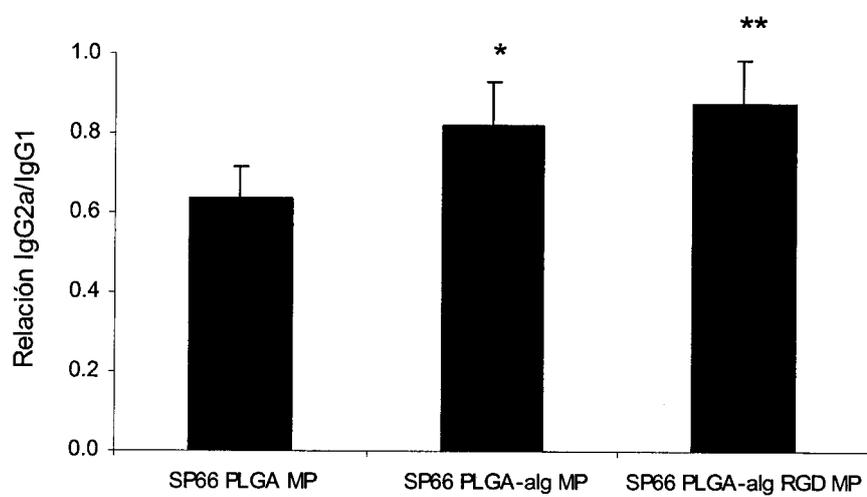
p > 0.05; ** p > 0.01 frente a SPf66 PLGA MP

FIGURA 3



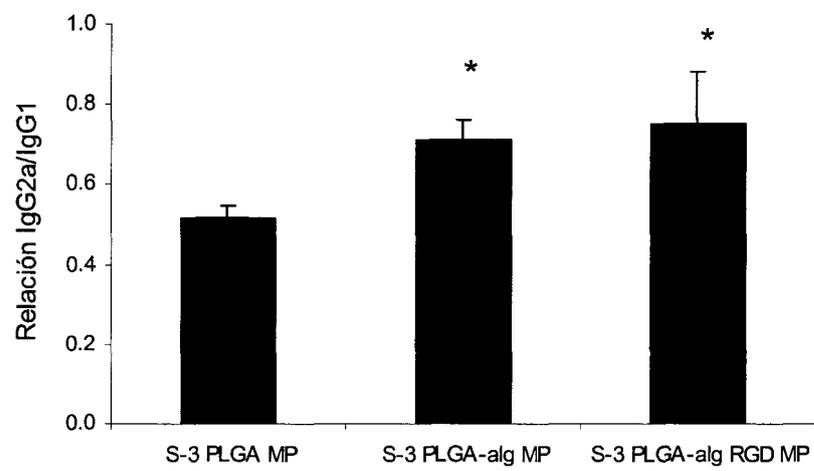
p > 0.05; ** p > 0.01 frente a S-3 PLGA MP

FIGURA 4



* $p > 0.01$; ** $p > 0.001$ frente a SP66 PLGA MP

FIGURA 5



p > 0.01; ** p > 0.001 frente a S-3 PLGA MP

FIGURA 6

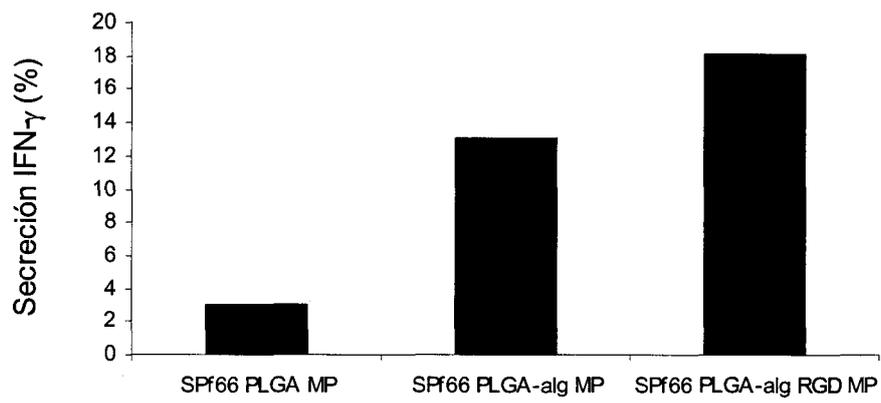


FIGURA 7

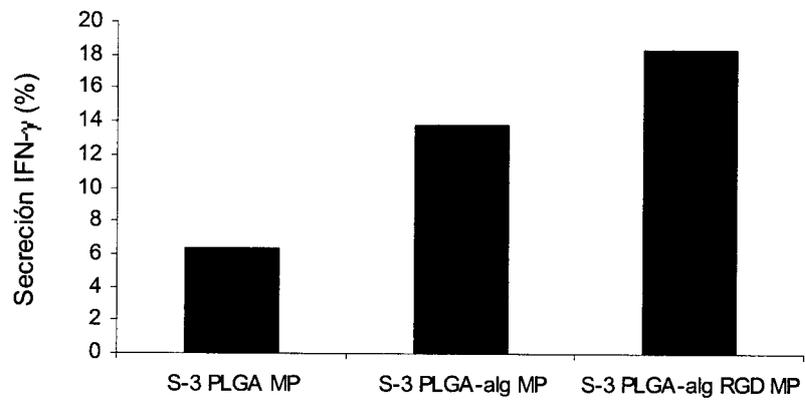


FIGURA 8

ES 2 358 703 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad del País Vasco

5 <120> EMPLEO DE MICROPARTÍCULAS PARA SU USO COMO VACUNAS Y LA LIBERACIÓN DE MOLÉ-
CULAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS

10 <130> P3046ES01

<160> 2

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 45

20 <212> PRT

<213> *Plasmodium falciparum*

<400> 1

25 Cys Gly Asp Glu Leu Glu Ala Glu Thr Gln Asn Val Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

30 Asn Ala Asn Pro Tyr Ser Leu Phe Gln Lys Glu Lys Met Val Leu Pro
20 25 30

35 Asn Ala Asn Pro Pro Ala Asn Lys Lys Asn Ala Gly Cys
35 40 45

<210> 2

<211> 41

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Secuencia de aminoácidos del péptido S3

<400> 2

50 Asp Glu Leu Glu Ala Glu Thr Gln Asn Val Tyr Ala Ala Pro Asn Ala
1 5 10 15

55 Asn Pro Tyr Ser Leu Phe Gln Lys Glu Lys Met Val Leu Pro Asn Ala
20 25 30

60 Asn Pro Pro Ala Asn Lys Lys Asn Ala
35 40

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200902068

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K9/51** (01.01.2006)
A61P37/04 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0135932 A2 (UNIV MICHIGAN et al.) 25.05.2001, página 32, líneas 27-31; página 33, líneas 1-20; ejemplo 2; página 28, líneas 7-30; página 29, líneas 1,2; reivindicaciones 36,38,53,96,97.	1-14
A	KR 20040066548 A (KOLON PHARMACEUTICAL CO LTD) 27.07.2004, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 14.02.2011]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200477, N° DE ACCESO 2004-781375.	1-14
A	MATA E et al.: "Adjuvant Activity of Polymer Microparticles and Montanide ISA 720 on Immune Responses to <i>Plasmodium falciparum</i> MSP2 Long Synthetic Peptides in Mice", <i>Vaccine</i> (2007), vol. 25, pp.: 877-885, todo el documento.	1-14
A	ROSAS, J E et al.: "Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica" <i>Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.</i> (2007), Vol. 36 (2), pp.: 134-153, todo el documento.	1-14
A	WO 9511010 A1 (GENENTECH INC) 27.04.1995, todo el documento.	1-14
A	US 2003230819 A1 (PARK KINAM et al.) 18.12.2003, todo el documento.	1-14
A	LIU X et al.: "Novel Polymeric Microspheres Containing Norcantharidin for Chemoembolization", <i>J. Control. Release</i> (2006), vol. 116 (1), pp.: 35-41, todo el documento.	1-14

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
17.02.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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 0135932 A2 (UNIV MICHIGAN et al.)	25.05.2001
D02	KR 20040066548 A (KOLON PHARMACEUTICAL CO LTD)	27.07.2004
D03	MATA E et al.: "Adjuvant Activity of Polymer Microparticles and Montanide ISA 720 on Immune Responses to <i>Plasmodium falciparum</i> MSP2 Long Synthetic Peptides in Mice", <i>Vaccine</i> (2007), vol. 25, pp.: 877-885, todo el documento.	
D04	ROSAS, J E et al.: "Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica" <i>Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.</i> (2007), Vol. 36 (2), pp.: 134-153, todo el documento.	
D05	WO 9511010 A1 (GENENTECH INC)	27.04.1995
D06	US 2003230819 A1 (PARK KINAM et al.)	18.12.2003
D07	LIU X et al.: " Novel Polymeric Microspheres Containing Norcantharidin for Chemoembolization", <i>J. Control. Release</i> (2006), vol. 116 (1), pp.: 35-41, todo el documento.	

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

La solicitud reivindica un procedimiento para preparar una micropartícula que contiene PLGA (ácido poli [láctico-glicólico], alginato y un péptido o una proteína inmunológicamente activos. El objeto de la invención es obtener un compuesto de liberación controlada que contenga péptidos o proteínas con capacidad antigénica, de manera que dichos compuestos puedan ser utilizados como vacunas, inmunomoduladores o inmunoestimuladores. La solicitud reivindica, asimismo, la propia micropartícula así obtenida, la composición y su uso.

D01-D07 reflejan el estado de la técnica anterior. Se considera que D01 representa el estado de la técnica más cercano. Así, este documento reivindica una serie de mezclas que contienen combinaciones de polímeros, como entre otros PLGA y alginato. Estas mezclas pueden contener una gran variedad de principios activos. En las páginas 28 y 29, y en las reivindicaciones 36, 38, 53, 87 y 96 se refiere específicamente al empleo de péptidos o proteínas con actividad inmunológica como principio activo.

A la vista de lo descrito en D01, se considera que dicho documento afecta de manera especialmente relevante al objeto de la invención reivindicado en la solicitud. Por ello, se determina que la solicitud no cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.