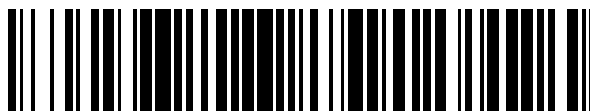


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 071**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09761922 .5**

96 Fecha de presentación: **20.05.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2293785**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2011**

54 Título: **Nanopartículas que contienen un péptido, vectores que las contienen y utilizaciones farmacéuticas de dichas nanopartículas y vectores**

30 Prioridad:
20.05.2008 FR 0853264

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) (50.0%)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITE DE STRASBOURG (50.0%)**

72 Inventor/es:
**DANICHER, LOUIS;
FRERE, YVES;
MULLER, SYLVIANE y
WAWREZINIECK, ANNE**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 391 071 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas que contienen un péptido, vectores que las contienen y utilizaciones farmacéuticas de dichas nanopartículas y vectores.

La presente invención tiene por objeto unas nanopartículas que contienen un péptido, así como unos vehículos, con o sin dispersante, que contienen dichas nanopartículas. La presente invención tiene asimismo por objeto unas utilizaciones farmacéuticas y/o terapéuticas de dichos vectores, en particular para el tratamiento del lupus eritematoso diseminado.

El lupus eritematoso diseminado (LED) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica muy incapacitante que afecta en la actualidad a varios millones de personas en el mundo. Esta enfermedad resulta de una disfunción del sistema inmunitario que reconoce los elementos de uno mismo como extraños y desarrolla entonces una respuesta inmune incluyendo una producción de anticuerpos contra los propios constituyentes del organismo.

Una vía terapéutica prometedora se basa en la utilización de secuencias peptídicas derivadas de auto-antígenos que pueden modular la respuesta autoinmune interfiriendo con la producción de los auto-anticuerpos. Para ello, la solicitud internacional WO 03/025014 describe la utilización de péptidos específicos en el ámbito del tratamiento del lupus eritematoso diseminado. Más particularmente, esta solicitud internacional describe la utilización del péptido P140, que es un análogo fosforilado sobre el residuo serina en posición 140 del péptido 131-151 de la proteína espliceosomal U1-70K (proteína específica de la partícula U1-snRNP), en particular en el ámbito del tratamiento del lupus eritematoso diseminado.

En la actualidad, el péptido P140 se administra mediante inyección subcutánea, que no es un modo de administración cómodo para el paciente. Así, se han probado varios modos diferentes de administración. Así, se ha probado la administración intranasal en el ratón pero no es eficaz.

En el campo terapéutico, las vías de administración de los principios activos más habituales son las vías oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Sin embargo, la vía oral, que es la más fisiológica y la más cómoda para el paciente, no se puede utilizar para numerosas sustancias activas como los péptidos o las proteínas. En efecto, estas macromoléculas de tipo péptido o proteico padecen numerosos ataques a lo largo del tracto gastrointestinal que alteran su estructura y su función biológica. Por otra parte, su paso a través de la pared intestinal está limitado por su tamaño y su carácter hidrófilo. Todo esto explica la poca biodisponibilidad de las proteínas administradas por vía oral (del orden del 1 al 2%).

Así, uno de los objetivos de la presente invención consiste en mejorar la eficacia del péptido P140 mencionado anteriormente en el marco de una administración por vía oral.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar el péptido P140 en forma encapsulada, administrable por vía oral, y que permita alcanzar el mismo tipo de células con la misma eficacia que cuando se administra el péptido por vía subcutánea.

La presente invención tiene por lo tanto por objetivo proporcionar un sistema de administración por vía oral del péptido P140 mencionado anteriormente, que posee unas características de disponibilidad de dicho péptido comparables a las características de inyección directa en la sangre de dicho péptido.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un sistema de administración que permita la liberación de dicho péptido que esté poco o nada desnaturalizado o degradado durante una administración por vía oral.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un sistema de administración que permita que dicho péptido alcance y/o atravesase la pared intestinal sin ser desnaturalizado o degradado sustancialmente.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un sistema de administración que permita que dicho péptido que ha atravesado la pared intestinal, esté disponible en la sangre, eventualmente después del paso al líquido intersticial.

Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un sistema de administración por vía oral del péptido P140 en el que dicho péptido no está, o está poco desnaturalizado o degradado durante el paso en el tracto gastrointestinal y durante el paso de la pared intestinal, y que permita una disponibilidad inmediata, retardada o prolongada en la sangre.

La presente invención se refiere a unas nanopartículas que comprenden una matriz constituida por lo menos por un polisacárido y un péptido P140 de secuencia SEC ID nº 1, o uno de sus análogos, siendo dicho polisacárido preferentemente un polisacárido portador de grupo(s) funcional(es) cargado(s) negativamente.

El péptido P140 es un péptido de 21 residuos de aminoácidos de una masa molar de 2636 Da que corresponde a la

secuencia siguiente: RIHMVYSKRSGKPRGYAFIEY, en la que la serina en posición 10 está fosforilada (SEC ID nº 1).

5 La expresión "análogos del péptido P140" designa unos péptidos que comprenden la secuencia SEC ID nº 1 mencionada anteriormente, en la que uno por lo menos de los aminoácidos comprende una modificación de tipo post-traducciona, en particular mediante fosforilación o acetilación. Entre los análogos, se puede hacer referencia a los péptidos descritos en la solicitud internacional WO 03/025014.

10 La expresión "grupo(s) funcional(es) cargado(s) negativamente" designa unas funciones químicas tales como, por ejemplo, los grupos carboxílicos.

El polisacárido que constituye la matriz debe ser biocompatible, biodegradable y bioasimilable (metabolizable).

15 Según otro modo de realización, las nanopartículas según la invención se pueden preparar a partir de una matriz constituida por una mezcla de polisacáridos y por el péptido P140. Más particularmente, estas nanopartículas pueden comprender una matriz constituida por el péptido P140 y por una mezcla de ácido hialurónico y de quitosano.

20 Según un modo particularmente ventajoso, las nanopartículas según la invención se obtienen mediante coacervación compleja entre el péptido y el polisacárido.

Según un modo de realización ventajoso, las nanopartículas según la presente invención comprenden una matriz constituida por ácido hialurónico.

25 El ácido hialurónico es no tóxico, biocompatible y metabolizable ya que está presente en numerosos tejidos.

En este modo de realización, las nanopartículas se obtienen mediante coacervación compleja entre el péptido P140 y el ácido hialurónico.

30 Preferentemente, el tamaño de las nanopartículas según la invención está comprendido entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 μ m.

35 Según un modo de realización particularmente ventajoso, en las nanopartículas según la presente invención, la relación másica entre el polisacárido y el péptido está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10, y en particular está comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5, y preferentemente es igual a aproximadamente 1.

Esta relación másica influye sobre la relación entre las cargas positivas y negativas presentes en la disolución.

40 Se ha constatado que el valor de esta relación másica influye sobre el tamaño de las nanopartículas obtenidas.

45 Preferentemente, cuando el polisacárido es el ácido hialurónico, esta relación es igual a aproximadamente 1 (1,5 carga negativa para 1 carga positiva), lo cual permite entonces asegurar la estabilidad coloidal. Cuando esta relación es igual a 1, se obtienen entonces unas nanopartículas esféricas de un diámetro próximo a 200 nm, y de carga de superficie negativa ($\xi = -30$ mV), que pueden ser fácilmente centrifugadas y que son estables durante varias semanas a 4°C.

50 Las nanopartículas preferidas según la presente invención son unas nanopartículas tales como las definidas anteriormente, en las que la masa molar del polisacárido está comprendida entre aproximadamente 1000 Da y aproximadamente 1500000 Da, y preferentemente entre aproximadamente 15000 Da y aproximadamente 50000 Da, y en particular entre aproximadamente 20000 Da y aproximadamente 30000 Da.

55 Preferentemente, las nanopartículas están preparadas a partir de ácido hialurónico de masa molar igual a 27600 Da. En este caso, las nanopartículas obtenidas tienen un tamaño próximo a 200 nm, y son perfectamente esféricas. Son entonces también muy monodispersas con un índice de polidispersidad inferior a 0,1. Estas partículas pueden ser aisladas del medio de síntesis mediante centrifugación a una velocidad de 2370 G sin problemas de agregación. Presentan una carga de superficie negativa con un potencial zeta del orden de -30 mV. Su superficie está recubierta mayoritariamente de ácido hialurónico, y el péptido P140, de carga positiva, condensado en el interior, está protegido del entorno exterior por este polielectrolito. Esta carga de superficie asegura una buena estabilidad de la suspensión al almacenamiento (por lo menos dos semanas a 4°C) y a la centrifugación.

La presente invención se refiere asimismo a un vector complejo para la administración por vía oral constituido por un vehículo que comprende por lo menos una nanopartícula tal como se ha definido anteriormente.

65 Las nanopartículas y el vehículo son dos vectores, teniendo el primero como objetivo hacer que el péptido franquee la barrera intestinal y el segundo hacer que la nanopartícula franquee el medio gástrico. El conjunto de estos dos

vectores forma un vector complejo.

La administración del péptido P140 (o análogo) por vía oral consiste realmente en aportar, desde la boca hacia la sangre o los tejidos, dicho péptido, sin que éste sea sustancialmente desnaturalizado o degradado. Se entiende así que la dosis de péptido P140 (o análogo) administrada por vía oral debe poder encontrarse de manera sustancialmente cualitativa y cuantitativa en la sangre o los tejidos. Por "sustancialmente cualitativa y cuantitativa" se entiende que la cantidad de péptido P140 (o análogo) en la sangre o en los tejidos con respecto a la cantidad de P140 (o análogo) administrada por vía oral debe ser superior, y ventajosamente, a por lo menos el 20%, en particular superior al 50%, preferentemente superior al 65%, ventajosamente superior al 80%, de manera óptima superior al 90%.

Preferentemente, la nanopartícula contenida en el vector complejo tal como se ha definido anteriormente es bioasimilable o metabolizable a un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, en particular entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,7, y preferentemente entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,5.

Durante una administración por vía oral, la sustancia activa desde el punto de vista farmacológico (péptido P140 o análogo) debe franquear todos los obstáculos presentes en un organismo antes de llegar al flujo sanguíneo o a los tejidos, sin sufrir ninguna desnaturalización o degradación sustanciales. Los principales obstáculos y dificultades, tenidos en cuenta en el marco de la presente invención, son en primer lugar el paso de la sustancia activa al estómago, el tiempo de estancia en el lumen intestinal, la adhesión a las microvellosidades presentes en el intestino, el paso desde el intestino hacia la sangre, eventualmente a través del líquido intersticial.

La sustancia activa (péptido P140 o análogo) administrada por vía oral debe llegar sin desnaturalización o degradación sustancial a la sangre o al líquido intersticial o a los tejidos.

Considerando que las características de la sangre y del medio intersticial son diferentes de los otros órganos (estómago, intestino entre otros) atravesados desde la cavidad bucal, los inventores han imaginado un vector para el péptido P140 (o análogo), vector que pueda ser biocompatible y bioasimilable o metabolizable.

Así, este vector debe ser hidrófilo, para ser compatible con los diversos fluidos corporales (líquido linfático, líquido intersticial, sangre, etc.). El vector debe además liberar rápidamente, o de manera prolongada o de manera retardada, el péptido P140 a un pH comprendido entre aproximadamente 6,7 y 7,7, idealmente entre aproximadamente 7,2 y 7,5, para permitir que el péptido P140 esté después disponible en la sangre, a través del vector y/o después de la degradación de éste.

Sin entrar en consideraciones mecánicas complejas, se considera que el vector esta degradado por las enzimas presentes en el medio (Lisozima, esterases, glicosidasas, etc.). La degradación del vector permitirá la liberación inmediata, prolongada o retardada del péptido P140 en el líquido intersticial para alcanzar la circulación sanguínea o los tejidos. Una vez en la sangre, el péptido P140 interactuará con los sitios de interés, o será transportado hasta los sitios u órganos, con el fin de producir el efecto farmacológico deseado.

Además, este vector debe ser optimizado de manera que su naturaleza hidrófila sea modificada con el fin de hacerla compatible con la pared del intestino. En efecto, la pared del intestino recubierta de una mucosa es un medio esencialmente lipófilo cuyo pH es superior a aproximadamente 7,8. Conviene por consiguiente modificar el vector descrito anteriormente, de manera que sea esencialmente lipófilo cerca y sobre la pared intestinal, que presente una muco-adhesión relativamente buena y por último que resista al entorno entérico (medio básico de pH superior a aproximadamente 7,8, presencia de enzimas de degradación, etc.).

Según un modo de realización ventajoso, el vector complejo según la presente invención tiene su mayor dimensión comprendida entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 2,5 μ m, preferentemente entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1 μ m, y en particular entre aproximadamente 0,5 μ m y aproximadamente 2 μ m.

Conviene además que el vector (nanopartícula) presente en el lumen del intestino posea un tamaño y una forma que permita el paso físico de dicho vector a través de la membrana intestinal.

Un tamaño inferior a aproximadamente 10 nm es asimismo menos preferido, pudiendo ser demasiado baja la cantidad de sustancia activa transportada por el vector. En efecto, el tamaño del vector de nanopartícula está limitado por el lugar de paso de la nanopartícula (vía paracelular, vía transcelular, vía linfática).

La presente invención se refiere asimismo a un vector complejo tal como se ha definido anteriormente, en el que el vehículo se presenta en forma de esferas de diámetro comprendido entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 2,5 μ m, preferentemente entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1 μ m, y en particular entre aproximadamente 0,5 μ m y aproximadamente 2 μ m.

La forma del vector (nanopartícula) no tiene importancia específica en sí, siempre que permita un paso fácil a través

de la pared intestinal. Así, el vector se podrá presentar en cualquier forma conocida, por ejemplo esfera, espagueti, ovoide, etc.

5 Cuando el vector complejo se presenta en forma de esferas, éste se puede preparar según las técnicas clásicas de encapsulación de sustancias activas, tales como, por ejemplo, mediante coacervación, simple o compleja, policondensación interfacial, nebulización/secado (spray-drying), revestimiento en lecho fluidizado (spray-coating), etc.

10 El vector (nanopartícula) según la presente invención comprende una matriz que contiene el péptido P140. Para ello, la matriz puede estar concebida en forma de un gel que contiene dicho péptido o uno de sus análogos. Según otro aspecto, la matriz se presenta en forma de una esfera que contiene dicho péptido o uno de sus análogos. Son posibles asimismo otras formas, por ejemplo unas formas de tipo "esponja" o cualquier otra forma sólida más o menos compacta y que puede liberar mediante difusión y/o después de la degradación, la o las sustancias activas (péptido P140 o uno de sus análogos) que contienen.

15 Se debe señalar que, además de la o de las sustancias activas, el vector (nanopartícula) puede contener también cualquier excipiente, carga, colorante, y demás apropiados, conocidos por el experto en la materia, y no tóxicos desde el punto de vista farmacológico.

20 Según un modo de realización particularmente ventajoso, el vector complejo según la invención comprende un vehículo destinado a una protección gástrica.

25 Para ser eficaz en el plano farmacológico, este vector complejo destinado a ser administrado por vía oral debe presentar además una fuerte resistencia al medio estomacal por el que transitará antes de llegar al intestino. El estómago es en efecto un órgano en el que el pH es muy ácido (alrededor de 2, incluso inferior). Además, las enzimas presentes (en particular la pepsina) en el estómago pueden desnaturalizar, dañar o incluso destruir completamente dicho vector y por lo tanto la o las sustancias activas que contiene.

30 Por lo tanto, es deseable proporcionar una protección gástrica al vector definido anteriormente. Por protección gástrica del vector, se entiende cualquier vehículo capaz de proteger dicho vector de las limitaciones fisiológicas inherentes al estómago, siendo estas limitaciones principalmente el pH ácido y las enzimas estomacales (pepsina). Evidentemente, los constituyentes del vehículo, así como sus productos de desnaturalización o de degradación deben ser no tóxicos para el organismo y biotolerados.

35 Dichos vehículos ya se conocen ampliamente en el campo (medicamentos encapsulados por ejemplo, tal como se describe en "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Marcel Dekker, (1992), J. Swarbrick y J. C. Boylan editores, *Enteric Coatings*, p. 189-200). Se puede utilizar por lo tanto cualquier vehículo gastrorresistente conocido por el experto en la materia. Preferentemente, puede ser de naturaleza sólida, en forma de gel, o presentarse en forma de un revestimiento o de una cápsula, y contener uno o varios vectores tales como se han definido anteriormente, a su vez en diversas formas, cápsulas, geles u otros.

45 Según un aspecto preferido de la presente invención, el vehículo gastrorresistente se presenta en forma de una cápsula que contiene uno o varios vectores tales como se han definido anteriormente. Dichos vehículos en forma de cápsula pueden ser obtenidos ventajosamente mediante unos procedimientos de tipo coacervación, policondensación interfacial en medio dispersado, u otro. Evidentemente, se puede utilizar y/o adaptar para preparar los vehículos de la invención cualquier otro procedimiento conocido de encapsulación.

50 Entre los constituyentes capaces de resistir a las limitaciones fisiológicas inherentes al estómago, se pueden citar en particular los alginatos, como el alginato de calcio, la carboximetilcelulosa, y otros, así como sus mezclas. El vehículo gastroprotector deberá resistir a un pH ácido, en particular inferior a 2 y más particularmente inferior a 1,2, así como a los ataques de las enzimas gástricas.

55 Evidentemente, los constituyentes del vehículo deben poseer como características poder ser modificados o degradados de manera específica en el lumen del intestino, es decir a un pH superior a aproximadamente 7,8 y en presencia de las enzimas entéricas, con el fin de liberar el vector (nanopartícula) en el lumen del intestino.

Un vector complejo particular según la presente invención es un vector complejo en el que el vehículo está en forma de una matriz esférica.

60 Preferentemente, el vector complejo está en forma de esferas de aproximadamente 1,5 mm de diámetro.

En el marco de la presente invención, el vehículo tal como se ha definido anteriormente puede estar en forma de una cápsula esférica.

65 Según un modo de realización particularmente preferido, cuando el vehículo está en forma de una matriz esférica o de una cápsula esférica, éste es a base de alginato, en particular en forma de una esfera o de una cápsula de

alginato.

En el marco de la presente invención, el vehículo puede estar en forma de una matriz esférica obtenida mediante extrusión de una disolución de alginato de sodio en un baño de CaCl_2 .

Por otra parte, todos los polímeros gelificantes biocompatibles, bioasimilables y/o metabolizables, pueden ser utilizados para formar las matrices esféricas o las cápsulas esféricas.

La presente invención se refiere asimismo a un vector complejo tal como se ha definido anteriormente, en el que el vehículo contiene un dispersante lipófilo.

Además, el vehículo gastrorresistente puede contener eventualmente un medio lipófilo, en el que están presentes el o los vectores (nanopartículas) definidos anteriormente. Este medio lipófilo puede estar en forma sólida, líquida o también en forma de gel. El medio lipófilo puede estar constituido por cualquier compuesto lipófilo conocido en sí y no tóxico desde el punto de vista farmacológico. El compuesto lipófilo considerado puede estar seleccionado por ejemplo de entre los aceites orgánicos o minerales, vegetales o animales, por ejemplo el aceite de oliva, el aceite de hígado de bacalao, los aceites silicona, y otros, así como sus mezclas.

De manera preferida, el dispersante lipófilo mencionado anteriormente está seleccionado de entre el grupo de los aceites orgánicos o minerales, vegetales o animales, y sus mezclas.

Ventajosamente, el dispersante lipófilo mencionado anteriormente es una mezcla de ésteres de ácidos grasos, en particular seleccionados de entre el grupo constituido por los ácidos caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, linoleico y succínico.

La presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende por lo menos una nanopartícula tal como se ha definido anteriormente o por lo menos un vector complejo tal como se ha definido anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de por lo menos una nanopartícula tal como se ha definido anteriormente o por lo menos un vector tal como se ha definido anteriormente, a título de medicamento.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de por lo menos una nanopartícula tal como se ha definido anteriormente o por lo menos un vector tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades autoinmunes, y en particular del lupus eritematoso diseminado.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de por lo menos una nanopartícula tal como se ha definido anteriormente para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, y en particular el lupus eritematoso diseminado.

La presente invención se refiere asimismo a un vector complejo tal como se ha definido anteriormente para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, y en particular el lupus eritematoso diseminado.

Parte experimental

PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS HAP140

Las nanopartículas HAP140 son unas nanopartículas obtenidas mediante coacervación compleja entre el ácido hialurónico (HA) y el péptido P140.

El ácido hialurónico (5,2 mg; CERMAV Grenoble, Francia - masa molar de 27600 Da) se disuelve en 25 ml de agua bidestilada y se deja bajo agitación durante 24 horas con el fin de asegurar una buena disolución del polímero HA. El péptido P140 (200 μg) se pesa sobre una microbalanza y después se disuelve en 250 μl de agua bidestilada (pH 5,5). Después, se añade gota a gota con la ayuda de una micropipeta a la disolución de ácido hialurónico (1,05 ml; pH 6,5) en un tubo de ensayo provisto de una pequeña barra imantada que gira a 250 rpm^{-1} . El tubo de hemólisis que contiene el péptido se lava con 50 μl de agua bidestilada que se añaden a continuación a la suspensión.

La adición del péptido P140 al ácido hialurónico se acompaña de la formación progresiva de una parte turbia en la disolución. Después de 15 minutos de agitación, la suspensión se transfiere a un microtubo de 1,5 ml y se conserva a 4°C. No habiéndose formado ningún agregado, no se necesita ninguna etapa de filtración.

Las nanopartículas así obtenidas tienen las propiedades siguientes (distribución en tamaño e índice de polidispersidad):

HA	tamaño (nm)	% en número	Índice de polidispersidad
27600 Da	220	100	0,07

Estas nanopartículas son perfectamente esféricas (figura 1 - negativo de las nanopartículas obtenidas HAP140 mediante microscopio electrónico de transmisión) y muy monodispersas.

- 5 Preferentemente, estas nanopartículas se aíslan 24 horas después de su síntesis con el fin de asegurar una buena eficacia de encapsulación y después se conservan durante una semana a 4°C en agua bidestilada con el fin de alcanzar su equilibrio termodinámico y ser estables en medio salino y en medio intestinal simulado.

ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS HAP140 EN RATONES BALB/C

- 10 Una vez que se ha desarrollado la síntesis de las nanopartículas HAP140, se ha verificado que el péptido conserva su integridad cuando es condensado por el ácido hialurónico en forma de nanopartículas.

- 15 Se ha mostrado que el péptido P140 es inmunógeno cuando se administra en presencia de adyuvante en los ratones BALB/c. Con el fin de verificar que el péptido P140 es siempre reconocido por las células del sistema inmunitario, en particular las células T, cuando está en forma de partículas, se ha elegido administrar las nanopartículas HAP140 en presencia de adyuvantes a unos ratones BALB/c y comparar la respuesta inmunitaria inducida por la administración en presencia de adyuvante de nanopartículas HAP140 con la obtenida mediante una administración de péptido P140 libre.

20 1. Explicación detallada de la respuesta inmunitaria

- 25 Cuando un antígeno penetra en el organismo, éste es detectado y después internalizado por las células dendríticas y los macrófagos presentes en el sitio de infección (o de administración). Estas células se vuelven maduras y se unen a los vasos del sistema linfático en el que circula la linfa que transporta los desechos y los cuerpos extraños. Están encaminadas hacia los ganglios linfáticos, unos órganos linfoides secundarios colonizados por los linfocitos B y T. Es al nivel de estos ganglios que drenan el sitio de infección (o de inmunización) donde se elabora la respuesta inmune y cuando las células T son activadas tras la presentación del antígeno por las células dendríticas u otras células presentadoras de antígenos.

- 30 La mayoría de las proteínas o de los péptidos como el P140 son poco inmunógenos cuando se administran solos en ausencia de componentes que representan unas señales de peligro. Con el fin de obtener una fuerte respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno proteico, es necesario administrarlo en forma de mezcla con un adyuvante. La mayoría de los adyuvantes contienen unas bacterias muertas o unos componentes bacterianos que estimulan los macrófagos y favorecen la respuesta inmune. El adyuvante utilizado en este caso es el adyuvante completo de Freund (CFA). Se trata de un aceite que contiene unas microbacterias muertas que no sólo facilitan la presentación del antígeno por los macrófagos o las células dendríticas, sino que inducen también la producción de citoquinas inflamatorias y fuertes reacciones inflamatorias locales.

40 2. Administración de las nanopartículas HAP140 por vía sub-cutánea

- 45 La administración subcutánea (s.c.) de péptido P140 en presencia de adyuvante a unos ratones BALB/c conduce a la activación de las células T auxiliares Th [Monneaux, F., Lozano, J.M., Patarroyo, M.E., Briand, J.P., y Muller, S. (2003) T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 33, 287-296]. Esta activación se demuestra mediante el análisis de la proliferación y de la producción de citoquinas de las células T presentes en los ganglios que drenan el sitio de administración, estimuladas *ex vivo* con el péptido P140.

50 a) Protocolo

- 55 Unos ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad (4 grupos de dos ratones) son inmunizados al nivel de los costados con diferentes formulaciones por vía s.c. El primer grupo ha recibido el péptido P140 en presencia de CFA (grupo control), el segundo grupo ha recibido las nanopartículas HAP140 en presencia de CFA, el tercer grupo ha recibido las nanopartículas HAP140 en medio salino (con el fin de verificar que las partículas HAP140 no presentan carácter adyuvante en sí mismas), y el cuarto grupo ha recibido las nanopartículas "blancas" HACS en presencia de CFA (con el fin de verificar la especificidad de la respuesta inducida frente al péptido P140). Todos los ratones que han recibido un péptido en su forma libre o en su forma de nanopartículas, han recibido la misma cantidad de péptido, a saber 100 µg por ratón.

- 60 Una semana después de la inmunización, los ratones son sacrificados y se extraen los ganglios linfáticos del costado y de la pata delantera. Las células procedentes de estos ganglios son cultivadas *ex vivo* a razón de $5 \cdot 10^5$ células por pocillo en presencia de diferentes concentraciones de péptido (0, 6, 20 y 60 µM) con el fin de estudiar su proliferación así como la secreción de citoquinas.

Las citoquinas son unas proteínas de baja masa molar producidas por numerosas poblaciones celulares, incluyendo los linfocitos. Se pueden describir como las "hormonas" del sistema inmunitario ya que intervienen en las relaciones entre los linfocitos, los macrófagos y otras células. Sus funciones son muy diversas: pueden influir en la supervivencia, la proliferación, la diferenciación o también en la migración de las células.

5 Las células Th son clasificadas en sub-poblaciones, Th1 o Th2, según las citoquinas que producen y la función que ejercen. Las células de tipo Th-1 producen en particular la interleucina-2 (IL-2) y el interferón- γ (IFN- γ) mientras que las células de tipo TH-2 segregan esencialmente la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-10 y la IL-13. Las condiciones de inmunización utilizadas en este caso, es decir la utilización de CFA, favorecen el desarrollo de una respuesta de tipo Th1. Por lo tanto, se ha estudiado únicamente la secreción de IL-2 y de IFN- γ .

Si la inmunización es eficaz, se activarán las células Th de los ganglios que drenan el sitio de la inmunización y, en presencia del péptido P140, proliferarán y segregarán unas citoquinas.

15 *b) Resultados*

Dos formulaciones, el péptido en presencia de adyuvante y las partículas HAP140 en presencia del adyuvante, han dado unos índices de estimulación positivos y dosis-dependientes, lo cual indica una respuesta proliferativa específica del péptido P140. Los índices de estimulación asociados a las partículas administradas en disolución salina siguen siendo muy bajos en comparación, mientras que los asociados a las partículas "blancas" son negativos.

25 Los resultados de secreción de las citoquinas confirman los de la proliferación: se han obtenido dos respuestas dosis-dependientes en el caso de la administración del péptido y de las nanopartículas HAP140, ambos inyectados en presencia de CFA. Las partículas administradas solas llevan únicamente a la producción de una baja cantidad de IL-2 que no es dosis-dependiente y probablemente tampoco significativa, y no lleva a ninguna producción de IFN- γ . La administración de partículas "blancas" no induce la secreción de ninguna citoquina.

30 El péptido está por lo tanto liberado de las nanopartículas HAP140 en su forma nativa ya que la administración s.c. de ésta en presencia de CFA genera la misma respuesta específica que la administración del péptido libre en presencia de CFA. Los índices de estimulación obtenidos así como las concentraciones en citoquinas segregadas son similares para estas dos informaciones. Parece por lo tanto que la totalidad del péptido condensado en las partículas esté preservada después de una administración s.c. a los ratones.

35 Además, se muestra que el ácido hialurónico no presenta ningún carácter adyuvante, siendo la co-administración de CFA necesaria para la obtención de una respuesta dosis-dependiente. Esto es muy importante, ya que en el marco del establecimiento de protocolos terapéuticos en el ratón lúpico, se debe evitar cualquier efecto adyuvante puesto que tendría como consecuencia potencial acelerar el desarrollo de la enfermedad [Monneaux, *et al.* (2003) Eur. J. Immunol. 33, 287- 296].

40 Por último, la administración de partículas "blancas" HACS no genera ninguna respuesta inmunitaria, demostrando así que la respuesta medida es bien específica del péptido P140 y no de las partículas solas.

45 3. Administración de las nanopartículas HAP140 por vía intraduodenal

Tras los resultados obtenidos en el párrafo anterior, la formación de las nanopartículas HAP140 se realiza en unas condiciones no degradantes para el péptido y éste se libera en su forma nativa en el organismo después de una administración s.c. Esta vía de administración está, sin embargo, alejada de la vía de administración considerada, a saber la vía oral.

50 En el vector farmacéutico complejo descrito anteriormente, las nanopartículas están protegidas por un vehículo ácido-resistente en el estómago, y después se liberan en el intestino con el fin de atravesar el epitelio intestinal. Con el fin de mimetizar la utilización de este vector, las nanopartículas son administradas en el segmento inicial del intestino delgado, el duodeno. Esta vía de administración permite verificar que las nanopartículas son estables en medio intestinal, que el péptido está protegido de los ataques enzimáticos y que por lo menos una fracción de éste atraviesa intacta la barrera intestinal.

55 *a) Protocolo*

60 Unos ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad son inmunizados con diferentes formulaciones por diferentes vías de administración. El primer grupo ha recibido el péptido P140 en presencia de CFA por vía s.c., el segundo grupo ha recibido las nanopartículas HAP140 en presencia de CFA por vía intra-duodenal y el tercer grupo ha recibido las nanopartículas "blancas" HACS en presencia de CFA por vía intra-duodenal. Todos los ratones que han recibido el péptido, o bien en su forma libre, o bien en forma de nanopartículas, han recibido la misma cantidad de péptido, a saber 100 μ g por ratón, sea cual sea la vía de administración utilizada.

La inmunización por vía intra-duodenal se realiza bajo anestesia. Se practica entonces una ligera incisión a nivel del abdomen con el fin de extraer el segmento superior del intestino de la cavidad abdominal y realizar la administración en el duodeno. La incisión se cose de nuevo después y el animal se mantiene bajo una lámpara calentadora hasta que se despierte.

5 Una semana después de la inmunización, los ratones son sacrificados y se extraen los ganglios que drenan el sitio de administración. En el caso de la administración intra-duodenal, se trata de los ganglios mesentéricos que forman una cadena a lo largo del intestino y que drenan la mucosa intestinal. Las células procedentes de estos ganglios son cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de péptido P140 según el protocolo descrito en el párrafo anterior.

b) Resultados

15 Los resultados obtenidos por vía intra-duodenal se han superpuesto a los obtenidos anteriormente por vía s.c. para permitir una comparación. Se señala que los ganglios mesentéricos de los ratones que han recibido las partículas HAP140 en presencia de CFA por vía intra-duodenal están hipertrofiados, señal de que han sido el sitio de una respuesta inmunitaria.

20 La proliferación de las células procedentes de los ratones inmunizados con las partículas HAP140 por vía intra-duodenal, en presencia de adyuvante es realmente dosis-dependiente y los índices de estimulación son del mismo orden de tamaño que los obtenidos mediante administración s.c. del péptido P140 libre en presencia de adyuvante. Los índices de estimulación asociados a las partículas "blancas" HACS administradas por vía intra-duodenal no son significativos, sea cual sea la concentración en péptido, señal de que las células ganglionarias no han proliferado.

25 La administración intra-duodenal de partículas HAP140 en presencia de adyuvante conlleva una secreción de citoquinas de tipo Th1 más baja que en el caso de una administración sub-cutánea. Esto es particularmente evidente para el IFN- γ . Sin embargo, las secreciones de IL-2 y de IFN- γ siguen siendo dosis-dependientes y los índices de proliferación celular son del mismo orden de tamaño que los obtenidos por vía s.c. La administración de nanopartículas HAP140 por vía intraduodenal permite por lo tanto activar las células Th de los ganglios mesentéricos.

30 Así, el péptido es capaz de activar eficazmente las células Th, señal de que está en su forma nativa. Las partículas son por lo tanto suficientemente estables en el medio intestinal *in vivo* para proteger el péptido de los ataques enzimáticos.

35 PROTOCOLO TERAPÉUTICO EN EL RATÓN LÚPICO MRL/lpr POR ADMINISTRACIÓN INTRA-DUODENAL DE NANOPARTÍCULAS HAP140

40 Con el fin de estudiar la eficacia terapéutica de la administración intra-duodenal de las nanopartículas HAP140, se ha emprendido un protocolo terapéutico en el ratón lúpico.

45 Con el fin de estudiar el potencial terapéutico de las nanopartículas HAP140, unos ratones pre-lúpicos han recibido tres administraciones de estas partículas por vía intra-duodenal en ausencia de adyuvante, espaciadas cada una de dos semanas. Para permitir una comparación de la evolución de la enfermedad y estudiar la eficacia de las nanopartículas, un grupo de ratones ha recibido unas nanopartículas HACS sin péptido denominadas "blancas".

Protocolo

50 Se han separado al principio de los experimentos unos ratones pre-lúpicos MRL/lpr hembras de 5 semanas de edad. El primer grupo, constituido por 8 ratones, ha recibido 100 μ g de P140 en forma de nanopartículas HAP140 por vía intra-duodenal y el segundo, grupo control constituido por 5 ratones, ha recibido 100 μ g de quitosano en forma de nanopartículas HACS también por vía intra-duodenal. La primera administración se realiza con 5 semanas de edad y está seguida de otras dos administraciones espaciadas de dos semanas (es decir a 7 y 9 semanas de edad). Los síntomas de la enfermedad lúpica, como la aparición en particular de una proteinuria (presencia de proteínas en la orina medida en una tira reactiva), se han seguido regularmente durante más de 45 semanas y se ha establecido un perfil de mortalidad.

Resultados

60 La administración intra-duodenal de nanopartículas HAP140 retrasa la aparición de la proteinuria en los ratones lúpicos MRL/lpr. En efecto, este síntoma aparece sólo a las 15 semanas de edad en los ratones tratados y a las 12 semanas en el grupo de ratones control no tratados. Su proteinuria sigue siendo todavía menos frecuente que la desarrollada por los ratones control.

65 La administración de las nanopartículas HAP140 parece también tener un efecto beneficioso sobre la mortalidad de los animales tratados. En primer lugar, la administración retrasa significativamente el inicio de la curva de mortalidad.

En efecto, si en el grupo control, los primeros ratones mueren a las 15 semanas, es sólo a partir de las 22 semanas cuando el primer ratón murió en el grupo que recibió las nanopartículas HAP140. Este intervalo es particularmente interesante si se considera que según los datos de la bibliografía, la duración de vida de un ratón lúpico MRL/lpr no excede de 35 semanas.

Estos datos están confirmados por otra parte en el presente estudio, ya que a la edad de 37 semanas, todos los ratones del grupo control han muerto. De manera interesante, el 50% de los ratones que han recibido las nanopartículas están todavía vivos a esta edad, y lo están todavía a las 45 semanas, es decir una vida media de los ratones no tratados de 25 semanas, a comparar con una vida media de los ratones tratados de 45 semanas.

La administración de nanopartículas HAP140 por vía intra-duodenal en unos ratones pre-lúpicos permite por lo tanto alargar de manera significativa su duración de vida.

Así, la administración intra-duodenal de nanopartículas HAP140 permite no sólo retrasar la aparición de señales clínicas de la enfermedad como la proteinuria, sino que permite también alargar la duración de vida de los animales de manera muy significativa.

Una parte por lo menos de las partículas o de la dosis de péptido es por lo tanto capaz de atravesar la barrera intestinal y alcanzar la circulación sistémica y/o las células dianas.

ESTUDIO DEL FRANQUEO DE LA BARRERA INTESTINAL

Con el fin de estudiar el paso de las nanopartículas a través de la pared intestinal, se ha desarrollado un modelo *in vitro* que utiliza una línea de células humanas cancerígenas de colon (Caco-2). Estas células son capaces de diferenciarse en enterocitos durante su cultivo, mimetizando así la capa de células que constituye la pared intestinal.

Las observaciones con microscopio electrónico de transmisión han podido demostrar la diferenciación de estas células después de 13 días de cultivo (presencia de vellosidades y de desmosomas). Estas células contienen muchos orgánitos de un tamaño parecido al de las nanopartículas sintetizadas, lo cual dificulta su identificación.

Se ha realizado por lo tanto unas observaciones por microscopio confocal con el fin de observar el paso de las partículas a través de este modelo de epitelio. Para ello, el quitosano se ha acoplado al isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se han sintetizado unas nanopartículas HACS_{FITC}. Estas partículas poseen unas características (tamaño, estado de superficie) parecidas a las de las partículas HAP140 y pueden ser obtenidas en cantidad suficiente para los estudios considerados. Las observaciones en microscopio confocal han demostrado la presencia de nanopartículas no sólo en superficie de las células sino también en su citoplasma. Se ha demostrado que el paso de las partículas a las células se realiza mediante un mecanismo probablemente activo ya que éste tiene lugar a 37°C pero no a 4°C. Unos estudios por citometría de flujo han demostrado por otra parte que la absorción de las partículas se realiza no sólo de manera dosis-dependiente, sino que aumenta también con la duración de la incubación. La presencia de las nanopartículas en el citoplasma de las células Caco-2 se ha confirmado mediante microscopía electrónica de transmisión gracias a la utilización de un anticuerpo anti-FITC acoplado a unas bolas de oro.

Este modelo celular presenta sin embargo unas diferencias frente a un epitelio intestinal, como la ausencia de mucosidad o de células M. Se han administrado por lo tanto unas nanopartículas fluorescentes por vía intraduodenal a unos ratones lúpicos y se han realizado unos cortes de intestino con el fin de observar el paso de estas nanopartículas. Una fuerte intensidad de fluorescencia se encuentra a nivel del lumen intestinal y de la mucosidad, conocido por atrapar las partículas. Unas partículas fluorescentes se detectan asimismo en el interior de las vellosidades y hasta la membrana basal del intestino. Así, aunque la mayoría de las partículas permanece a nivel de la mucosidad, una cantidad no despreciable de ellas son capaces de atravesar el epitelio intestinal.

SÍNTESIS DE UN VEHÍCULO ÁCIDO-RESISTENTE EN ALGINATO QUE CONTIENE UN ACEITE FARMACÉUTICO

1. Protocolo de síntesis del vehículo

Principio de la síntesis

El protocolo utilizado para la obtención de dicho vehículo es el siguiente: carbonato de calcio finamente triturado se dispersa en un aceite farmacéutico de tipo Miglyol[®]. Esta suspensión se añade gota a gota con un caudal de 20 ml/h por medio de una jeringa equipada con una aguja de acero inoxidable (diámetro de la aguja de 0,9 mm) en un baño de alginato de sodio que contiene el ácido acético glacial. En contacto con esta disolución ácida, el carbonato de calcio liberará unos iones de calcio en la interfaz aceite/agua que se complejarán entonces con el alginato y formarán una membrana alrededor de cada gota de aceite. Las cápsulas así obtenidas tendrán por lo tanto un tamaño de algunos milímetros, parecido al de la de la gota de aceite formada en la salida de la aguja.

Se vierten 100 ml de una disolución de alginato de muy baja viscosidad al 0,5% (w/v) que contiene el 1% (v/v) de

ácido acético glacial en un pequeño reactor de 250 ml equipado con un agitador mecánico en forma de ancla. El carbonato de calcio (500 mg) se dispersa finamente en 5 ml de Miglyol® 829 (densidad de 1 a 1,02). Esta dispersión se añade después gota a gota por medio de una jeringa equipada con una aguja de acero inoxidable (diámetro de la aguja de 0,9 mm) en la disolución ácida de alginato a un caudal constante de 20 ml/h. Una vez terminada la adición, el sistema se deja bajo agitación a 150 rpm durante una hora con el fin de dar tiempo a los iones de calcio para migrar hacia la disolución acuosa y complejar el alginato en superficie de las gotas de aceite. Los vehículos son después diluidos en un gran volumen de agua para facilitar su filtración sobre un sistema de filtración, por ejemplo Millipore (3 µm). Con el fin de reforzar la reticulación del alginato, después se sumergen en una disolución de cloruro de calcio durante 30 minutos y después se conservan a 4°C en agua. Se obtienen así unos vehículos esféricos de un diámetro comprendido entre 1,5 mm y 2 mm y de un grosor de membrana próxima a 500 µm.

2. Estabilidad del vehículo en medios fisiológicos reconstituidos

La estabilidad de estos vehículos se ha evaluado en medio gástrico e intestinal simulados. Se ha estudiado muy particularmente la influencia de la duración de síntesis de los vehículos (duración de puesta en contacto de las gotas de aceite que contienen el carbonato de calcio con la disolución ácida de alginato) en su estabilidad.

La inmersión de estos vehículos en medio gástrico simulado conduce a una disminución del grosor de su membrana en alginato visible a simple vista. Este fenómeno es similar al observado para el primer tipo de vehículo desarrollado en este capítulo: con pH ácido, el alginato se precipita en ácido alginico, lo cual se acompaña de una retracción del gel. La membrana de los vehículos puesta en contacto con el alginato durante por lo menos 30 minutos sigue intacta después de 4 horas de inmersión en medio gástrico simulado. No es el caso para los vehículos cuya duración de síntesis es inferior a 15 minutos: la delgada cápsula de alginato así obtenida se rompe y libera su contenido, a saber el aceite, en este medio ácido. Los vehículos deben por lo tanto ser conservados por lo menos durante 30 minutos en el baño de alginato con el fin de ser estables durante 4 horas en medio gástrico simulado.

Cuando los vehículos son transferidos en medio intestinal simulado, se observa una ruptura muy rápida de las membranas de los vehículos, adelgazada por su estancia en el medio ácido. En menos de 30 minutos, todos los vehículos se degradan y la totalidad del aceite se libera en el medio. La degradación es tanto más rápida por cuanto que los vehículos se han quedado poco tiempo en contacto con la disolución de alginato durante su síntesis. Así, unos vehículos sumergidos durante 1 hora en el baño de alginato se degradan en 30 minutos en medio intestinal simulado mientras que 5 minutos son suficientes para degradar la totalidad de los vehículos sumergidos sólo durante 30 minutos en este mismo baño de alginato.

Tabla 1:

Influencia de la duración de reticulación del alginato de calcio en la estabilidad de los vehículos obtenidos en medio gástrico simulado y después en medio intestinal simulado

Duración de la reticulación del alginato	Estabilidad en medio gástrico simulado (4h)	Estabilidad en medio intestinal simulado
15 min.	No	X
30 min.	Sí	5 min.
45 min.	Sí	15 min.
1h	Sí	30 min.

Por lo tanto, es posible actuar sobre el tiempo de inmersión de los vehículos en el baño de alginato durante su síntesis para acelerar o ralentizar el fenómeno de degradación observado en medio intestinal simulado.

La degradación de los vehículos en medio intestinal simulado debe ser suficientemente rápida para tener lugar en el segmento superior del intestino: si la degradación del vehículo no tiene lugar lo suficientemente pronto, las nanopartículas seguirán atrapadas durante una parte de su estancia en el intestino y no podrán entrar en contacto con el epitelio intestinal. Una duración de incubación de 30 a 45 minutos en el baño de alginato parece ser óptima ya que permite obtener unos vehículos no sólo estables durante 4 horas en medio gástrico, sino que parece que se degradan también rápidamente (5 a 15 minutos) en medio intestinal simulado.

Este nuevo vehículo desempeña por lo tanto *in vitro* sus dos funciones principales: resistir a un pH ácido durante 4 horas y proteger así las nanopartículas durante su paso por el estómago, y degradarse rápidamente en el medio intestinal con el fin de liberarlas.

3. Miniaturización del vehículo - estudio preliminar

Con el objetivo de administrar el vector complejo por vía oral a unos ratones, es necesario miniaturizar el vehículo.

a) Principio de la síntesis

5 La obtención de pequeñas cápsulas de alginato de núcleo oleoso se basa en una simple modificación del protocolo utilizado anteriormente: se obtiene una emulsión de aceite en agua mediante homogeneización de una suspensión de carbonato de calcio en Miglyol® 829 con una disolución acuosa de alginato. La adición de ácido acético glacial en esta emulsión permite iniciar la migración del carbonato de calcio hacia el alginato y la liberación de cationes Ca²⁺, llevando entonces a la formación de membranas de alginato reticulado alrededor de cada una de las gotitas de aceite.

10 b) Protocolo de síntesis

15 El CaCO₃ (100 mg) se dispersa en 1 ml de aceite farmacéutico Miglyol® 829, y después esta dispersión se homogeneiza en una disolución de alginato de muy baja viscosidad al 0,5% (w/v). La emulsión se obtiene con la ayuda de un homogeneizador (Ultra-Turrax® T25 basik IKA® Werke) utilizado a una velocidad de 600 rpm durante 5 minutos. El ácido acético glacial (500 µl) se añade entonces gota a gota con el fin de iniciar la liberación de los cationes de calcio y la formación de la membrana en alginato alrededor de las gotitas.

20 Estas condiciones llevan a la formación de capsulas esféricas de alginato con núcleo oleoso de un tamaño de algunas decenas de µm.

PREPARACIÓN DE UN VECTOR SEGÚN LA INVENCION

25 El protocolo de síntesis de un vector complejo es idéntico al de los vehículos, sustituyendo el aceite farmacéutico Miglyol® 829 por una dispersión de nanopartículas que contiene el péptido P140 (o análogo) en el aceite farmacéutico Miglyol® 829, manteniéndose el resto del protocolo sin cambios.

Listado de secuencias

30 <110> CNRS
Université Louis Pasteur

<120> Nanopartículas que contienen un péptido, vectores que las contienen y utilizations farmacéuticas de dichas nanopartículas y vectores

35 <130> BFF 07P0605

<160> 1

40 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

50 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 1

Arg Ile His Met Val Tyr Ser Lys Arg Ser Gly Lys Pro Arg Gly Tyr
1 5 10 15

Ala Phe Ile Glu Tyr
20

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartícula que comprende una matriz constituida por lo menos por un polisacárido y por el péptido P140 de secuencia SEC ID nº 1, o por uno de sus análogos, siendo dicho polisacárido preferentemente un polisacárido portador de grupo(s) funcional(es) cargado(s) negativamente.
2. Nanopartícula según la reivindicación 1, caracterizada porque el polisacárido es el ácido hialurónico.
- 10 3. Nanopartícula según la reivindicación 1 ó 2, cuyo tamaño está comprendido entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 µm.
- 15 4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la relación másica entre el polisacárido y el péptido está comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10, y en particular comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5, y preferentemente es igual a aproximadamente 1.
- 20 5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la masa molar del polisacárido está comprendida entre aproximadamente 1000 Da y aproximadamente 1500000 Da, y preferentemente entre aproximadamente 15000 Da y aproximadamente 50000 Da, y en particular entre aproximadamente 20000 Da y aproximadamente 30000 Da.
- 25 6. Vector complejo para administración por vía oral constituido por un vehículo que comprende por lo menos una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Vector complejo según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende un vehículo destinado a una protección gástrica.
- 30 8. Vector complejo según la reivindicación 7, caracterizado porque el vehículo está en forma de una matriz esférica o de una cápsula esférica.
9. Vector complejo según la reivindicación 8, caracterizado porque el vehículo es a base de alginato, en particular en forma de una esfera o de una cápsula de alginato.
- 35 10. Vector complejo según la reivindicación 7, caracterizado porque el vehículo contiene un dispersante lipófilo, seleccionado en particular de entre el grupo constituido por los aceites orgánicos o minerales, vegetales o animales, y sus mezclas, y es preferentemente una mezcla de ésteres de ácidos grasos, en particular seleccionados de entre el grupo constituido por los ácidos caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, linoleico y succínico.
- 40 11. Composición farmacéutica que comprende por lo menos una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o por lo menos un vector complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. Medicamento que comprende por lo menos una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o por lo menos un vector complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
- 50 13. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su utilización para el tratamiento de enfermedades auto-inmunes, y en particular del lupus eritematoso diseminado.
14. Vector complejo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para su utilización para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, y en particular del lupus eritematoso diseminado.

