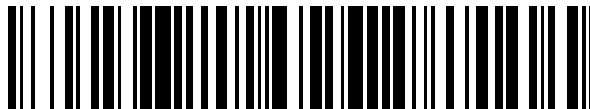


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 165**

21 Número de solicitud: 201830512

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/655 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.05.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.11.2018

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(42.9%)**

**SERVICIO DE PROMOCIÓN Y APOYO A LA
INVESTIGACIÓN, LA INNOVACIÓN Y LA
TRANSFERENCIA. EDIFICIO NEXUS (6G) - 3ª
PLANTA. CAMÍ DE VERA, S/N.**

46021 VALENCIA ES;

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ (42.9%) y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (14.3%)**

72 Inventor/es:

**HERNANDEZ TERUEL, Adrian;
GONZALEZ ALVAREZ, Marta;
GONZALEZ ALVAREZ, Maria Isabel;
BERMEJO SANZ, Maria Del Val;
MERINO SANJUAN, Virginia;
SANCENON GALARZA, Felix y
MARTINEZ MAÑEZ, Ramon**

74 Agente/Representante:

MALDONADO JORDAN, Julia

54 Título: **SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MISMO**

57 Resumen:

La invención describe un sistema de liberación controlada en la región del colon para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de enfermedades, que comprende una matriz de sílice mesoporosa; un principio activo cargado en los poros de la matriz; y puertas moleculares funcionalizadas en los poros que impiden la liberación del principio activo. Las puertas moleculares están constituidas por un compuesto azoderivado que se desprende en presencia de actividad azorreductasa permitiendo así la liberación del principio activo. La invención también da a conocer un método de preparación de dicho sistema de liberación.

ES 2 692 165 A1

DESCRIPCIÓN

SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA Y MÉTODO DE PREPARACIÓN

DEL MISMO

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de manera general al campo de la administración de principios activos y en concreto de la liberación controlada de los mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere al campo de la liberación controlada de principios activos en la
10 región del colon.

Antecedentes de la invención

El continuo aumento de la incidencia y la prevalencia en la población mundial de enfermedades que afectan al
15 colon, especialmente las enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, principalmente), ha acaparado la atención y esfuerzo de muchos investigadores y de la industria farmacéutica para encontrar soluciones que sean realmente eficaces. Hasta el
20 momento, el arsenal terapéutico disponible no consigue solucionar el creciente problema.

En la última década, se han introducido distintos agentes biológicos (principalmente anti-TNF α), ampliando el arsenal terapéutico disponible para las EII. Sin embargo,
25 esto sigue sin ser suficiente, ya que muchos pacientes no responden o no lo hacen de manera continuada a estos tratamientos (dejan de ser eficaces). Además, su administración oral se ve limitada al tener que atravesar el estómago (donde la acidez del pH degrada los compuestos)
30 y el intestino delgado (donde puede absorberse gran parte de los compuestos antes de la llegada al lugar de acción, disminuyendo la eficacia y dando lugar a reacciones adversas no deseadas).

La mayor parte de las formulaciones denominadas de "liberación controlada" consisten en sistemas con una matriz (en algunos casos) o cubierta (en otros) polimérica que responde frente a los cambios de pH encontrados a lo
5 largo del tracto gastrointestinal. Debido a la gran inter e intravariabilidad en los sujetos del pH gastrointestinal (aún mayor en algunos casos afectados por colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), estos sistemas no consiguen ser suficientemente eficaces.

10 El documento WO2014037596 da a conocer un nanodispositivo para la liberación controlada de sustancias que comprende un soporte recubierto por oligosacáridos con al menos 3 unidades de monosacáridos, en el que al menos uno de los monosacáridos es galactosa. Estos
15 nanodispositivos liberan su carga de manera específica en células senescentes.

El documento WO2012117140A1 da a conocer un compuesto termosensible para la liberación controlada de al menos una sustancia activa o un indicador, que comprende: (a) un
20 soporte poroso formado por material poroso, cuyos poros contienen la sustancia activa o el indicador; y (b) una capa interfaz con moléculas de naturaleza lipófila, que tienen un primer extremo unido covalentemente al soporte poroso y un segundo extremo constituido por cadenas
25 orgánicas lipófilas unidas por interacciones no covalentes a una capa superficial termosensible situada sobre la superficie del soporte poroso, cubriendo los poros. La superficie termosensible está constituida por sustancias orgánicas de naturaleza lipófila no polimérica que, por
30 encima de una temperatura umbral, disminuyen su interacción con la capa interfaz, desbloqueando la entrada de los poros del soporte poroso y liberando la sustancia activa o el indicador.

El documento WO2012007623A2 da a conocer un sistema de liberación controlada formado por un soporte poroso con capacidad para contener una sustancia activa o un indicador, un oligonucleótido bloqueante de los poros del soporte y una capa interfaz entre el soporte poroso y el oligonucleótido que asegura la fijación entre estos elementos. La liberación de la sustancia activa se produce por hibridación del oligonucleótido bloqueante de los poros con su oligonucleótido complementario.

Por tanto, sigue existiendo en la técnica la necesidad de un sistema de liberación controlada que permita liberar de manera fiable un principio activo en la región del colon, evitando lo más posible su liberación en otras regiones del aparato digestivo, y se reduzca la aparición de efectos adversos.

Sumario de la invención

Para solucionar los problemas de la técnica anterior, la presente invención da a conocer, según un primer aspecto, un sistema de liberación controlada en la región del colon para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de enfermedades, preferiblemente de enfermedades relacionadas con el colon, que comprende:

- una matriz de sílice mesoporosa;
- un principio activo cargado en los poros de la matriz; y
- puertas moleculares funcionalizadas en la superficie que impiden la liberación del principio activo;

en el que las puertas moleculares están constituidas por un compuesto azoderivado que se fragmenta (al reducirse el enlace azoico) en presencia de actividad azorreductasa permitiendo así la liberación del principio activo.

En el tracto gastrointestinal del ser humano, la actividad azorreductasa es específica de la microbiota local del colon que produce enzimas con dicha actividad. Por tanto, el compuesto azoderivado del sistema de liberación según el primer aspecto de la presente invención se fragmentará (al reducirse el enlace azoico) al llegar al colon (y no antes) y permitirá la liberación del principio activo en el mismo.

Según un segundo aspecto, la presente invención da a conocer un método de preparación de un sistema de liberación controlada según el primer aspecto de la invención, que comprende las etapas de:

- a) derivatizar un compuesto azoderivado mediante reacción con un alcoxisilano en disolvente orgánico;
- b) encapsular un principio activo en una matriz de sílice mesoporosa mediante reacción en disolvente orgánico; y
- c) añadir a la etapa b) el compuesto azoderivado derivatizado con alcoxisilano obtenido en la etapa a).

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes dibujos con carácter ilustrativo y no limitativo de la invención:

La figura 1 es una representación esquemática de la encapsulación de colorante (rodamina B) o fármaco (hidrocortisona) en un material de sílice mesoporosa con los poros bloqueados por moléculas azoderivadas ancladas covalentemente a la superficie exterior (partículas S1 o S2) y su liberación mediante reducción enzimática de los enlaces azoicos.

La figura 2 es una representación esquemática de la reacción de síntesis de la puerta molecular que da lugar al azoderivado 1.

La figura 3 representa la cinética de liberación del fármaco encapsulado (hidrocortisona) a partir de una suspensión de micropartículas mesoporosas funcionalizadas con el azoderivado S2, en disolución acuosa a pH=2 (cuadrados), pH \approx 4,5 (círculos), pH \approx 7,4 (triángulos) y pH \approx 7,4 en presencia del agente azorreductor ditionito de sodio (SD, 2 mg/ml) (cruces).

La figura 4 representa la absorción sistémica *in vivo* (concentración de rodamina B μ g/ml en plasma) para sujetos (ratas Wistar) que reciben una disolución de colorante rodamina B o una suspensión con las partículas S1.

La figura 5 representa la liberación específica de la carga *in vivo* (concentración de rodamina B μ g/ml en el ciego, el colon y las heces) en sujetos (ratas Wistar) que reciben una disolución de colorante rodamina B o una suspensión con las partículas S1.

La figura 6 muestra imágenes de colon de rata de sujetos sacrificados en el día 10 tras la inducción de colitis con TNBS: A: control negativo (no se le administró TNBS), B: control positivo (grupo 1, tratamiento: suero salino), C (grupo 2, tratamiento: suspensión acuosa de micropartículas tipo MCM-41 vacías), D (grupo 3, tratamiento: disolución de hidrocortisona) y E (grupo 4, tratamiento: formulación de partículas S2 en suspensión acuosa).

La figura 7 muestra imágenes histológicas de colon de rata representativas de un sujeto sano A y de sujetos sacrificados en el día 10 tras la inducción de colitis con TNBS: B: control positivo (grupo 1, tratamiento: suero salino), C (grupo 2, tratamiento: suspensión acuosa de

micropartículas tipo MCM-41 vacías), D (grupo 3, tratamiento: disolución de hidrocortisona) y E (grupo 4, tratamiento: formulación de partículas S2 en suspensión acuosa).

5

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Tal como se mencionó anteriormente, en un primer aspecto la presente invención da a conocer un sistema de liberación controlada en la región del colon para el
10 tratamiento, la prevención o el diagnóstico de enfermedades, preferiblemente de enfermedades relacionadas con el colon, que comprende:

- una matriz de sílice mesoporosa;
- un principio activo cargado en los poros de la
15 matriz; y
- puertas moleculares funcionalizadas en la superficie que impiden la liberación del principio activo.

Las puertas moleculares están constituidas por un
20 compuesto azoderivado que se fragmenta (al reducirse el enlace azoico) en presencia de actividad azorreductasa permitiendo así la liberación del principio activo. En el tracto gastrointestinal del ser humano, la actividad azorreductasa es específica de la microbiota local del
25 colon que produce enzimas con dicha actividad, por lo que la liberación del principio activo se produce de manera específica en el colon.

Es por ello, que el sistema según la presente invención es adecuado para diversos tratamientos en los que
30 se requiera la liberación del principio activo en el colon. Hay que tener en cuenta que algunos principios activos, por ejemplo, anticuerpos, hormonas y entidades de origen proteico o peptídico, presentan una absorción deficitaria

en estómago o intestino delgado dada la existencia de una gran cantidad de enzimas proteolíticas. Sin embargo, al llegar protegidos al colon, pueden ser absorbidos en él una vez liberados.

5 El sistema según una realización preferente de la presente invención es adecuado para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el colon, tales como enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (por ejemplo, colitis ulcerosa y
10 enfermedad de Crohn), de manera más eficaz (ya que el principio activo se libera específicamente en el lugar de acción) y con menos efectos adversos (ya que no se libera principio activo en otros lugares del organismo).

Según una realización preferida de la presente
15 invención, la matriz de sílice mesoporosa es de tamaño micrométrico y presenta poros con un tamaño de poro de 2 a 3 nm, más preferiblemente la matriz de sílice mesoporosa es de tipo MCM-41.

Según una realización de la presente invención, el
20 principio activo incorporado en los poros de la matriz de sílice mesoporosa es para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria del intestino (tal como por ejemplo colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), tal como por ejemplo un fármaco esteroideo antiinflamatorio usado
25 por vía oral en casos de enfermedades inflamatorias intestinales de intensidad moderada a media, tal como por ejemplo hidrocortisona.

Según otra realización de la presente invención, las
puertas moleculares que bloquean los poros de la matriz de
30 sílice mesoporosa están preferiblemente constituidas por un compuesto azoderivado que, en presencia de actividad azorreductasa, experimenta reducción del enlace azoico dando lugar a un fragmento (5-ASA) que se libera y que

presenta propiedades antiinflamatorias. Por tanto, se produce una doble acción terapéutica procedente, por un lado, del principio activo liberado del interior de los poros y, por otro lado, del fragmento liberado procedente
5 de las puertas moleculares.

Esta característica se muestra en la figura 1, en la que puede apreciarse que en un primer momento (parte izquierda) el colorante (rodamina B) o el principio activo (hidrocortisona) está incluido dentro de los poros de la
10 matriz y bloqueado en los mismos por moléculas azoderivadas. Tras someterse a actividad azorreductasa, se liberan tanto el principio activo como el fragmento 5-ASA (parte derecha).

Según una realización preferida de la invención, el
15 compuesto azoderivado es olsalazina de sodio.

Según otra realización de la presente invención, el sistema de liberación controlada comprende además nanopartículas magnéticas incluidas dentro de la matriz de sílice mesoporosa. De este modo puede aumentarse el tiempo
20 de retención del sistema en la zona deseada (por ejemplo, en el colon) mediante la aplicación de un campo magnético externo.

Según un segundo aspecto, la presente invención también da a conocer un método de preparación de un sistema
25 de liberación controlada tal como se definió anteriormente en el presente documento. El método comprende las etapas de:

- a) derivatizar un compuesto azoderivado mediante reacción con un alcoxisilano en disolvente
30 orgánico;
- b) encapsular un principio activo en una matriz de sílice mesoporosa mediante reacción en disolvente orgánico; y

c) añadir a la etapa b) el compuesto azoderivado derivatizado con alcoxisilano obtenido en la etapa a).

Más concretamente, el método puede comprender
5 derivatizar un compuesto azoderivado con un alcoxisilano
(por ejemplo, 3-aminopropiltriethoxisilano) mediante
reacción en suspensión en tetrahidrofurano (THF) a
temperatura ambiente (20-25°C) bajo una atmósfera inerte
(Ar), preferiblemente durante al menos 48 horas. Por otro
10 lado, se encapsula el principio activo mediante agitación
vigorosa del mismo con micropartículas de sílice mesoporosa
en tetrahidrofurano (THF) a temperatura ambiente (20-25°C)
bajo una atmósfera inerte de argón (Ar), preferiblemente
durante al menos 8-12 horas. Por último, se añade el
15 compuesto azoderivado derivatizado anteriormente obtenido y
se continúa agitando a temperatura ambiente (20-25°C),
preferiblemente durante 4-8 horas.

A continuación se detallará adicionalmente la presente
invención mediante los siguientes ejemplos específicos.

20

Síntesis de micropartículas tipo MCM-41 (S0)

Se sintetizaron las micropartículas mesoporosas tipo
MCM-41 según el siguiente procedimiento:

En primer lugar, se calentó una disolución de
25 trietanolamina (TEAH₃, 25,79 g, 0,173 mol) e hidróxido de
sodio (NaOH, 2 ml de una disolución 6 M) hasta 120°C y
entonces se dejó enfriar hasta 70°C. En ese momento se
añadió ortosilicato de tetraetilo (TEOS, 11 ml, 0,045 mol)
a la reacción y se calentó hasta alcanzar nuevamente 120°C.
30 Volvió a dejarse enfriar la reacción y cuando disminuyó por
debajo de 118°C se añadió bromuro de n-cetiltrimetilamonio
(CTABr, 4,68 g, 0,013 mol). Cuando la temperatura disminuyó
hasta 70°C, se añadieron, poco a poco, 80 ml de agua

destilada con agitación constante. Se dejó envejecer esta mezcla en un autoclave a 100°C durante 24 h. Se recuperó el polvo resultante por filtración y se lavó con agua destilada. Finalmente, se secó el sólido en estufa a 70°C 5 (≈24 h). Para obtener el material mesoporoso final S0 (tipo MCM-41), se calcinó el sólido a 550°C usando una atmósfera oxidante durante 5 horas con el fin de eliminar el tensioactivo.

10 *Síntesis de la puerta molecular azoderivada (1)*

Se disolvió olsalazina de sodio (0,5 g, 1,65 mmol) en 30 ml de una disolución ácida a pH≈0 (28,5 ml de agua destilada y 1,5 ml de disolución de HCl al 37%). Se agitó la disolución durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-15 25°C) y se centrifugó. Se desechó el sobrenadante, se recuperó el producto protonado resultante y se dejó secar a 70°C durante 24 h. Se repitió este proceso 4 veces hasta obtener 1,8 g del producto 1a (véase la figura 2, rendimiento: 90%). A continuación, se disolvieron N,N'-20 diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1,042 g, 5 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 0,59 g, 5 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 25 ml). Se agitó esta reacción a temperatura ambiente (20-25°C), bajo atmósfera inerte de argón (Ar), durante 5 h. Se formó un precipitado25 blanco amarillento (DCU, diciclohexilurea) que se desechó tras centrifugación. Siguió agitándose el sobrenadante durante 15 h (bajo atmósfera inerte de Ar, a temperatura ambiente, 20-25°C). Después de 15 h de reacción, se centrifugó y volvió a desecharse el nuevo precipitado de30 DCU. Entonces, se añadió lentamente aminopropiltriétoxissilano (APTES, 1,2 ml, 5 mmol) y se dejó reaccionar durante 24 h (bajo atmósfera inerte de Ar, a temperatura ambiente 20-25°C). Se eliminó el disolvente

mediante rotaevaporación y se aisló el producto 1 (véase la figura 2) en forma de aceite amarillo anaranjado (2,05 g, 4,05 mmol, rendimiento: 80%).

5 *Encapsulación de colorante (rodamina B) en μ MCM-41 y funcionalización con el azoderivado (síntesis de partículas S1)*

Se suspendieron micropartículas tipo MCM-41 (S0, 1 g) en una disolución de THF (40 ml) y rodamina B (400 mg, 0,8 mmol/g de S0) bajo atmósfera inerte de Ar. Se dejó agitar esta disolución a temperatura ambiente (20-25°C) durante 8-12 h. A continuación, se disolvió el azoderivado 1 (2,05 g, 4,05 mmol/g de S0) en THF anhidro (25 ml) y se añadió a la suspensión de micropartículas/colorante. Se agitó la mezcla de reacción durante 6 h (bajo atmósfera inerte de Ar, a temperatura ambiente, 20-25°C). Tras lavar repetidamente con etanol y agua destilada, se aisló un sólido rojo, S1, que se dejó secar a vacío durante al menos 24 h.

20

Encapsulación de fármaco (hidrocortisona) en μ MCM-41 y funcionalización con el azoderivado (síntesis de partículas S2)

Se suspendieron micropartículas tipo MCM-41 (S0, 1 g) en una disolución de THF (40 ml) e hidrocortisona (296 mg, 0,8 mmol/g de S0) bajo atmósfera inerte de Ar. Se dejó agitar esta disolución a temperatura ambiente (20-25°C) durante 8-12 h. A continuación, se disolvió el azoderivado 1 (2,05 g, 4,05 mmol/g de S0) en THF anhidro (25 ml) y se añadió a la suspensión de micropartículas/colorante. Se agitó la mezcla de reacción durante 6 h (bajo atmósfera inerte de Ar, a temperatura ambiente, 20-25°C). Tras lavar repetidamente con etanol y agua destilada, se aisló un

sólido amarillo, S2, que se dejó secar a vacío durante al menos 24 h.

Estudios de liberación de hidrocortisona y 5-ASA.

5 En un experimento típico, se suspendieron 2 mg del sólido S2 en 2 ml de una disolución acuosa a pH seleccionado (pH= 2,0, 4,5 ó 7,4) y a pH=7,4 en presencia del agente azorreductor ditionito de sodio (capaz de reducir enlaces azoicos). Se recogieron alícuotas a los
10 tiempos t=0, 5 min, 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h. Se centrifugaron las muestras para garantizar la eliminación de restos o trazas del sólido y se analizó cada muestra mediante HPLC, para cuantificar los resultados (con la debida curva de calibrado) tanto de hidrocortisona como
15 de 5-ASA total.

Resultados (véanse la figura 3 y la tabla 1): Puede apreciarse que la liberación es despreciable a distintos pH en ausencia de actividad azorreductora. Sin embargo, la liberación de la carga (hidrocortisona) en presencia del
20 estímulo (actividad azorreductora) alcanza el 80% a las 6 h y presenta liberación total de 24,36 µg/mg de sólido a las 24 h. La liberación total de 5-ASA a las 24 h es de 93 µg/mg de sólido.

25 Tabla 1:

sólido	contenido orgánico (g/g de SiO ₂)	puerta (g/g de SiO ₂)	liberación de colorante / HC (µg/mg de sólido)	liberación de 5-ASA (µg/mg de sólido)
S1	0,2396	0,159	21,50	107
S2	0,1917	0,111	24,36	93

Ensayos in vivo de farmacocinética

Se anestesiaron mediante perfusión *in situ* 10 ratas Wistar (macho, peso aproximado de 300±30 g) para implantar la cánula yugular 24 h antes del experimento. Para ello, se
5 utilizó el método de canulación yugular permanente previamente descrito (Torres-Molina *et al.*, 1996). La cánula así implantada permite la recogida de muestras de sangre. Se asignaron los animales aleatoriamente a los siguientes grupos:

10 Grupo 1. Se les administró por vía oral 1 ml de una disolución de rodamina B (suero salino 750 µg/ml).

Grupo 2. Se les administraron por vía oral 1,75 ml de una suspensión que contenía 30 mg de la formulación S1 (que debería liberar 750 µg de rodamina B, aproximadamente).

15 Se recogieron muestras de sangre (0,6-0,7 ml) con jeringuillas heparinizadas, y se reemplazaron con un volumen igual de suero salino heparinado (10 UI/ml) a los tiempos de muestreo establecidos (t=15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h). Se separó el plasma inmediatamente
20 por centrifugación (10000 rpm durante 10 min) y se congeló a -20°C hasta que se procedió al análisis de las muestras. Al finalizar las 4 h, se sacrificaron los sujetos y se recogieron y se procesaron el ciego, el colon y las heces, para el análisis de la presencia de rodamina B.

25 Resultados (véanse las figuras 4 y 5): La absorción sistémica para los sujetos que recibieron la disolución de rodamina B alcanzó un máximo de 0,45 µg/ml, mientras que los sujetos que recibieron la formulación S1 no presentaron absorción sistémica o era despreciable. También se evaluó
30 la presencia de rodamina B en el ciego, el colon y las heces. Las concentraciones de rodamina B detectadas en el ciego y el colon fueron notablemente superiores para el

grupo que recibió la formulación S1.

Ensayos in vivo de la eficacia en un modelo de colitis ulcerosa

5 Inducción de la inflamación de colon. En este ejemplo particular, los estudios se llevaron a cabo con ratas Wistar macho de 8-12 semanas de edad y con un peso aproximado de entre 275-325 g. Se mantuvieron los animales en salas climatizadas a $22 \pm 3^\circ\text{C}$, humedad del $55 \pm 5\%$, con
10 ciclos de 12 h de luz/oscuridad y acceso libre al pienso y agua durante los estudios. Para inducir el modelo de inflamación crónica en el colon de la rata, se siguió el método descrito por Morris *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. En resumen, se separaron las ratas
15 aleatoriamente en los diferentes grupos de tratamiento, se les mantuvo en ayuno durante 48 h con acceso libre a agua y se anestesiaron con isofluorano. Se les insertó una cánula rectal hasta el colon (la punta de la cánula queda a aproximadamente 8 cm del orificio del ano). En este punto
20 se instila una disolución de 0,6 ml de TNBS (78 mg/kg de peso corporal) disuelto en etanol al 50% v/v (volumen total instilado de 0,6 ml). El grupo de control recibió 0,6 ml de una disolución de etanol al 50% v/v, administrada de manera similar a anteriormente. Se monitorizaron cada día la
25 inducción y el desarrollo de la inflamación durante los 10 días que duró el estudio. El día 10 tras la administración de TNBS, se sacrificaron las ratas con una sobredosis de anestesia. Se evaluó el desarrollo de la inflamación con respecto a la razón de peso de colon/peso corporal,
30 puntuación de actividad clínica y cambios histológicos.

Diseño de los tratamientos. Se dividieron las ratas en 4 grupos. Al grupo 1 (grupo de control, 3 ratas) se le administró suero salino, el grupo 2 (8 ratas) recibió una

suspensión de micropartículas tipo MCM-41 vacías, el grupo 3 (8 ratas) recibió una disolución de hidrocortisona y finalmente el grupo 4 (8 ratas) recibió una suspensión de la formulación S2 (micropartículas tipo MCM-41 con 5 hidrocortisona encapsulada y funcionalizadas con la puerta molecular azoderivada 1). La dosis administrada de hidrocortisona fue de 5,58 mg/kg/día, calculada según la dosis para seres humanos (Sandborn y Hanauer, 2003). Se administró esta dosis por vía oral una vez al día, durante 10 tres días en el período de inflamación más intensivo de la enfermedad (días 3, 4 y 5 tras la administración de TNBS).

Resultados (véanse las figuras 6 y 7): La figura 6A muestra la apariencia característica de un colon sano en rata a la cual no se le administró TNBS. La figura 6B 15 muestra el colon característico en sujetos tratados con suero salino (tratamiento con placebo, grupo 1) 10 días después de haberse inducido el modelo de colitis con TNBS. Las figuras 6C, 6D y 6E muestran la apariencia característica del colon en sujetos de los grupos 2, 3 y 4, 20 respectivamente. Todos los sujetos (ratas Wistar) se sacrificaron 10 días después de la instilación rectal de TNBS. Los resultados mostrados en la figura 6B y 6C (grupos 1 y 2) son muy similares, en ambos casos se aprecia tejido intestinal necrótico, engrosado y rígido. En el grupo 3 25 (figura 6D) parece que parte del tejido comienza a recuperarse. Continúan existiendo zonas de tejido necrótico y engrosado, aunque se han reducido. Sin embargo, los resultados para el grupo 4 (figura 6E) muestran, por lo general, que el tejido se ha recuperado y parece que sólo 30 pequeñas zonas no se han recuperado completamente.

Histológicamente, los resultados concuerdan con los resultados macroscópicos anteriormente comentados. El control negativo o sujeto sano muestra tejido intestinal

sano: mucosa sana, no afectada, enterocitos y células globulares, y entre ellos tejido conectivo (lámina propia, figura 7A), capa muscular, submucosa y capa muscular externa también en perfectas condiciones. Los grupos 1 y 2
5 muestran necrosis y pérdida de la mucosa necrotizada que se sustituye por tejido granular. También muestran un fuerte proceso inflamatorio presente en la lámina propia, submucosa y capa muscular externa. En las figuras 7B y 7C puede observarse el proceso de ulceración con necrosis
10 fibrilar de la superficie de la mucosa y tejido granuloso debajo del tejido necrótico. Los animales del grupo 3 presentan erosión superficial, con adelgazamiento de la mucosa acompañado por el engrosamiento de la capa muscular, y un proceso inflamatorio crónico que afecta a la mucosa y
15 submucosa con desarrollo temprano de folículos linfoides. Zonas minoritarias presentan una estructura de mucosa normal pero con una fuerte hiperplasia folicular en la capa muscular externa y zonas con necrosis, pérdida de mucosa y sustitución con tejido granular e inflamación (figura 7D).
20 El grupo 4 muestra por lo general estructura normal en su mucosa y una ligera presencia de inflamación en la capa muscular propia (figura 7E). Estos resultados sugieren que el grupo no tratado (grupo 1) y el grupo tratado con las micropartículas tipo MCM-41 vacías (grupo 2), presentan
25 fuertes lesiones e inflamación; mientras que el grupo 4 tratado con la formulación S2 muestra una notable mejora y recuperación de las lesiones en los tejidos, así como una importante reducción de la inflamación, recuperando casi por completo la estructura normal de la mucosa.

30

Como se puede ver, a diferencia de soluciones conocidas del estado de la técnica, el sistema de liberación controlada según la presente invención, presenta

una matriz silíceas mesoporosa que no se ve afectada por el paso a través del tracto gastrointestinal, y mantiene almacenado en sus poros el principio activo de elección gracias al bloqueo o impedimento que ejercen las puertas 5 moleculares ancladas covalentemente a la superficie de dicha matriz. Estas puertas moleculares confieren al sistema una gran especificidad, ya que la liberación del principio activo almacenado en sus poros se producirá en presencia de un estímulo externo específico, en este caso 10 de la actividad azoreductasa producida por las enzimas liberadas por ciertas especies de la microbiota local del colon. En el sistema según la presente invención, el fragmento liberado producirá un efecto terapéutico antiinflamatorio, que contribuye a la reparación el tejido 15 dañado, por tanto, tendrá un efecto beneficioso en el tratamiento de las enfermedades objetivo. Además, el fragmento liberado (5-ASA), al reducirse el enlace azoico presente en las puertas moleculares, posee propiedades farmacológicas antiinflamatorias, por lo que se produce una 20 doble acción terapéutica al liberarse la carga de las micropartículas y dicho fragmento. De esta manera, el sistema desarrollado posee especificidad en la liberación de carga o liberación controlada del fármaco en el colon, evitando la absorción sistémica de los principios activos 25 farmacológicos.

Tal como apreciará fácilmente el experto en la técnica a partir de la descripción anterior, el sistema de liberación controlada descrito en la presente invención puede usarse para vehiculizar principios activos 30 farmacológicos o entidades (bio)químicas hasta el colon minimizando la degradación de los compuestos activos y la absorción sistémica indebida, aumentando así la eficacia del tratamiento a la vez que se reduce o incluso se

eliminan los efectos adversos no deseados. Esto presenta interés tanto para el tratamiento o prevención de enfermedades que afectan al colon, como para aumentar la biodisponibilidad de fármacos de administración oral que se 5 absorben preferentemente en el colon y se degradan en tramos superiores del tracto gastrointestinal.

REIVINDICACIONES

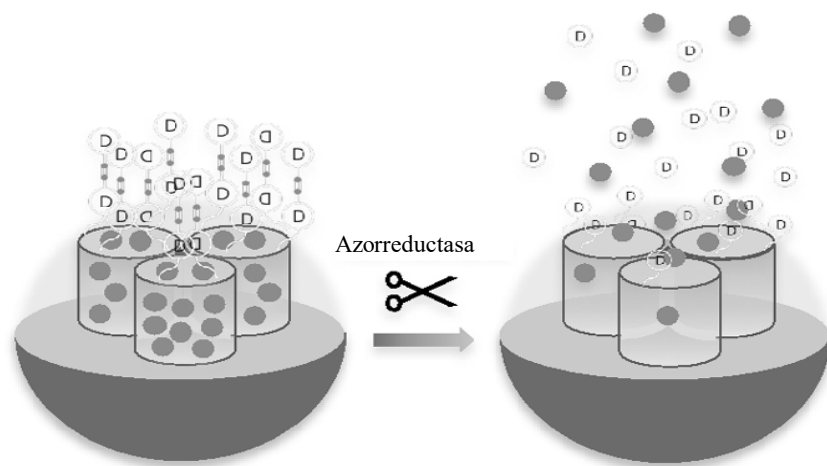
1. Sistema de liberación controlada en la región del colon para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de enfermedades, que comprende:
 - 5 - una matriz de sílice mesoporosa;
 - un principio activo cargado en los poros de la matriz; y
 - puertas moleculares funcionalizadas en la superficie que impiden la liberación del principio
- 10 activo;
en el que las puertas moleculares están constituidas por un compuesto azoderivado que se fragmenta en presencia de actividad azorreductasa permitiendo así la liberación del principio activo.
- 15 2. Sistema según la reivindicación 1, caracterizado por que la matriz de sílice mesoporosa es de tamaño micrométrico y presenta poros con un tamaño de poro de 2 a 3 nm.
3. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones
- 20 anteriores, caracterizado por que la matriz de sílice mesoporosa es de tipo MCM-41.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el principio activo es para el tratamiento o la prevención de una
- 25 enfermedad relacionada con el colon.
5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el principio activo es para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria del intestino.
- 30 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado por que el principio activo es un fármaco esteroideo antiinflamatorio.
7. Sistema según la reivindicación 6, caracterizado por

que el principio activo es hidrocortisona.

8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el principio activo es para el diagnóstico de una enfermedad relacionada con el colon.
9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las puertas moleculares están constituidas por un compuesto azoderivado que, en presencia de actividad azorreductasa, experimenta reducción del enlace azoico dando lugar a un fragmento con propiedades antiinflamatorias.
10. Sistema según la reivindicación 9, caracterizado por que el compuesto azoderivado es olsalazina de sodio.
11. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende además nanopartículas magnéticas incluidas dentro de la matriz de sílice mesoporosa.
12. Método de preparación de un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de:
- derivatizar un compuesto azoderivado mediante reacción con un alcoxisilano en disolvente orgánico;
 - encapsular un principio activo en una matriz de sílice mesoporosa mediante reacción en disolvente orgánico; y
 - añadir a la etapa b) el compuesto azoderivado derivatizado con alcoxisilano obtenido en la etapa a).
13. Método según la reivindicación 12, caracterizado por que las diversas etapas se llevan a cabo bajo atmósfera inerte.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado por que el disolvente orgánico de las diversas etapas es tetrahidrofurano.
- 5 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado por que las diversas etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, caracterizado por que el alcoxisilano empleado en la etapa a) es 3-aminopropiltriétoxisisilano.

10



● ⇒ Rodamina B (S1) / Hidrocortisona (S2)

D ⇒ 5-ASA

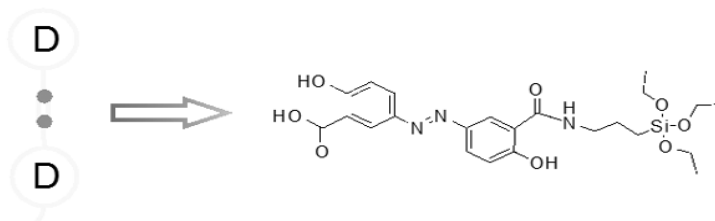


FIGURA 1

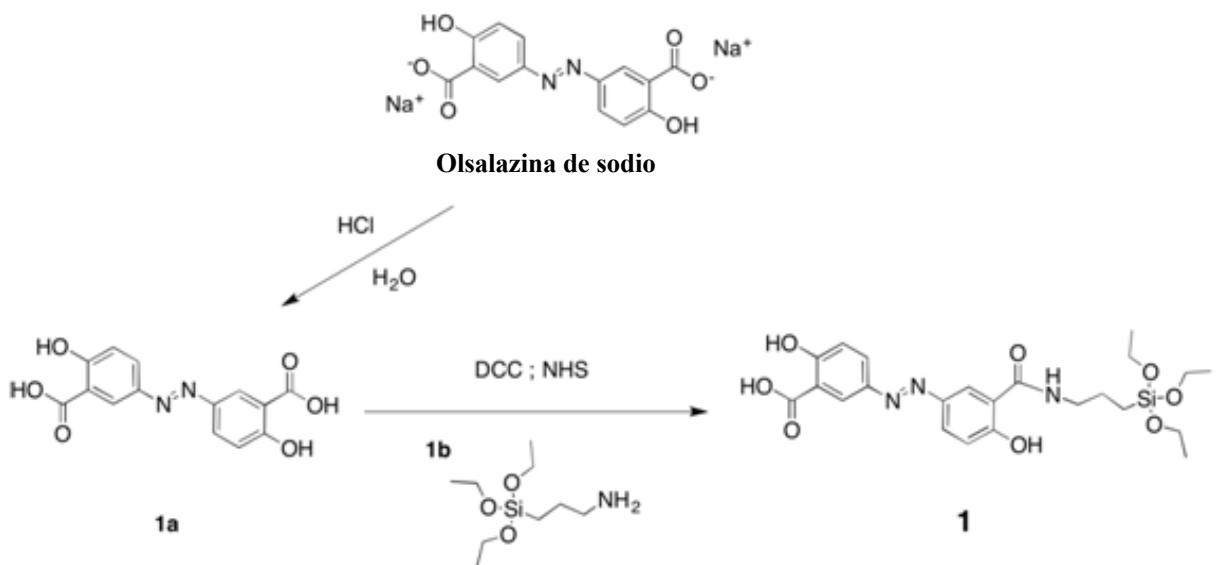


FIGURA 2

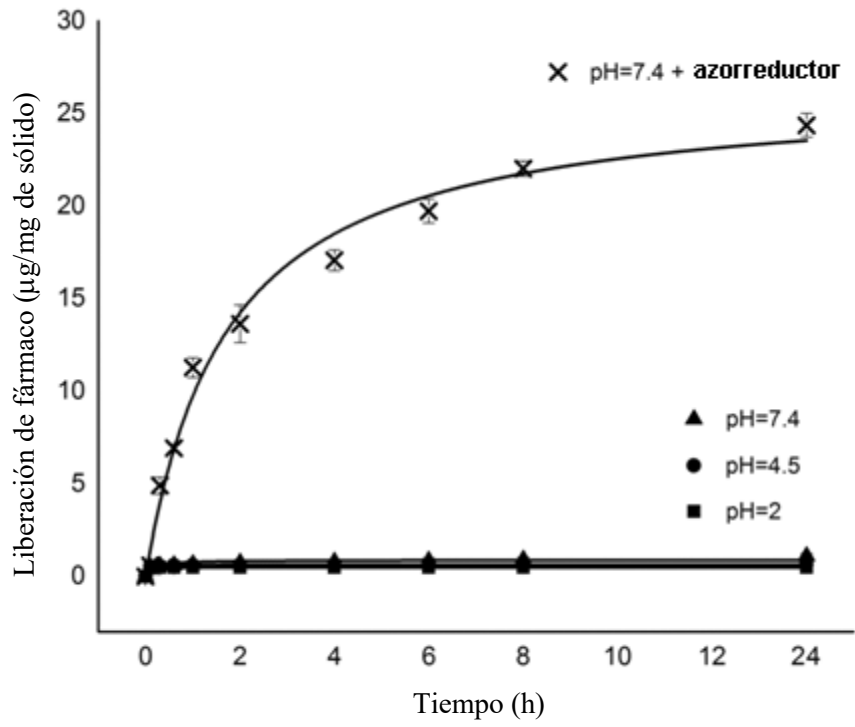


FIGURA 3

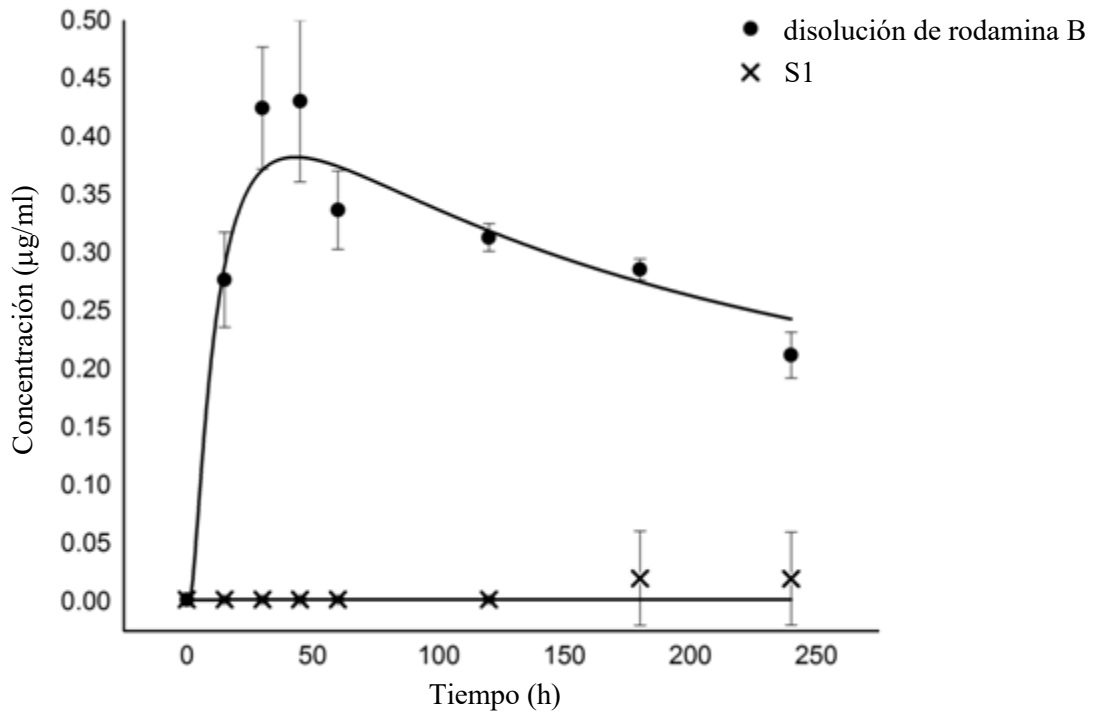


FIGURA 4

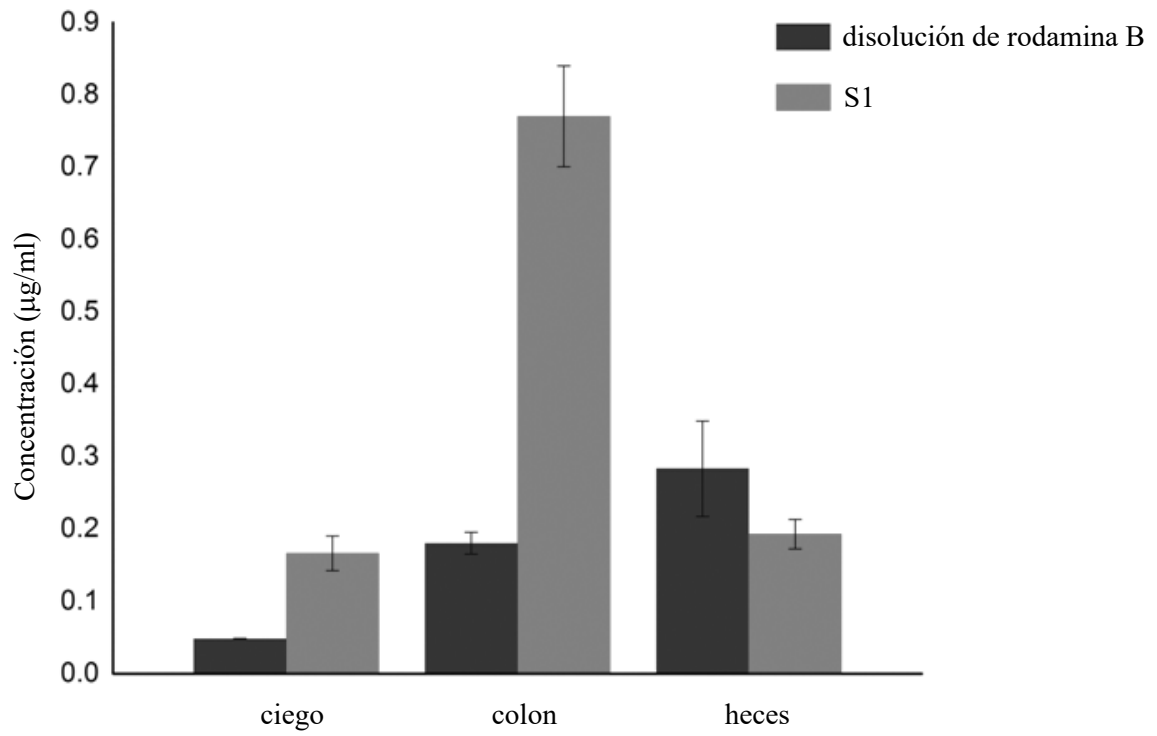


FIGURA 5

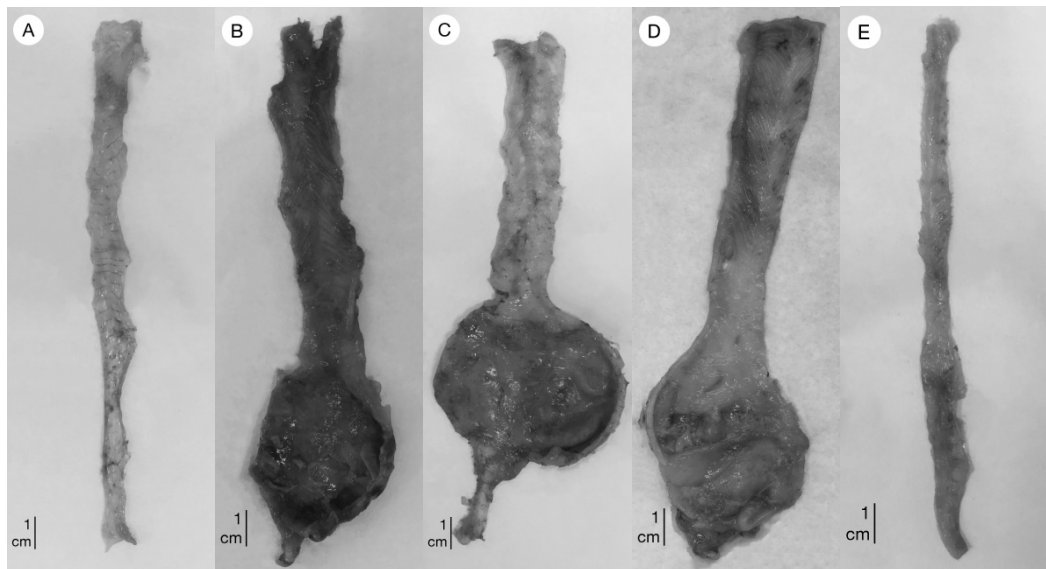


FIGURA 6

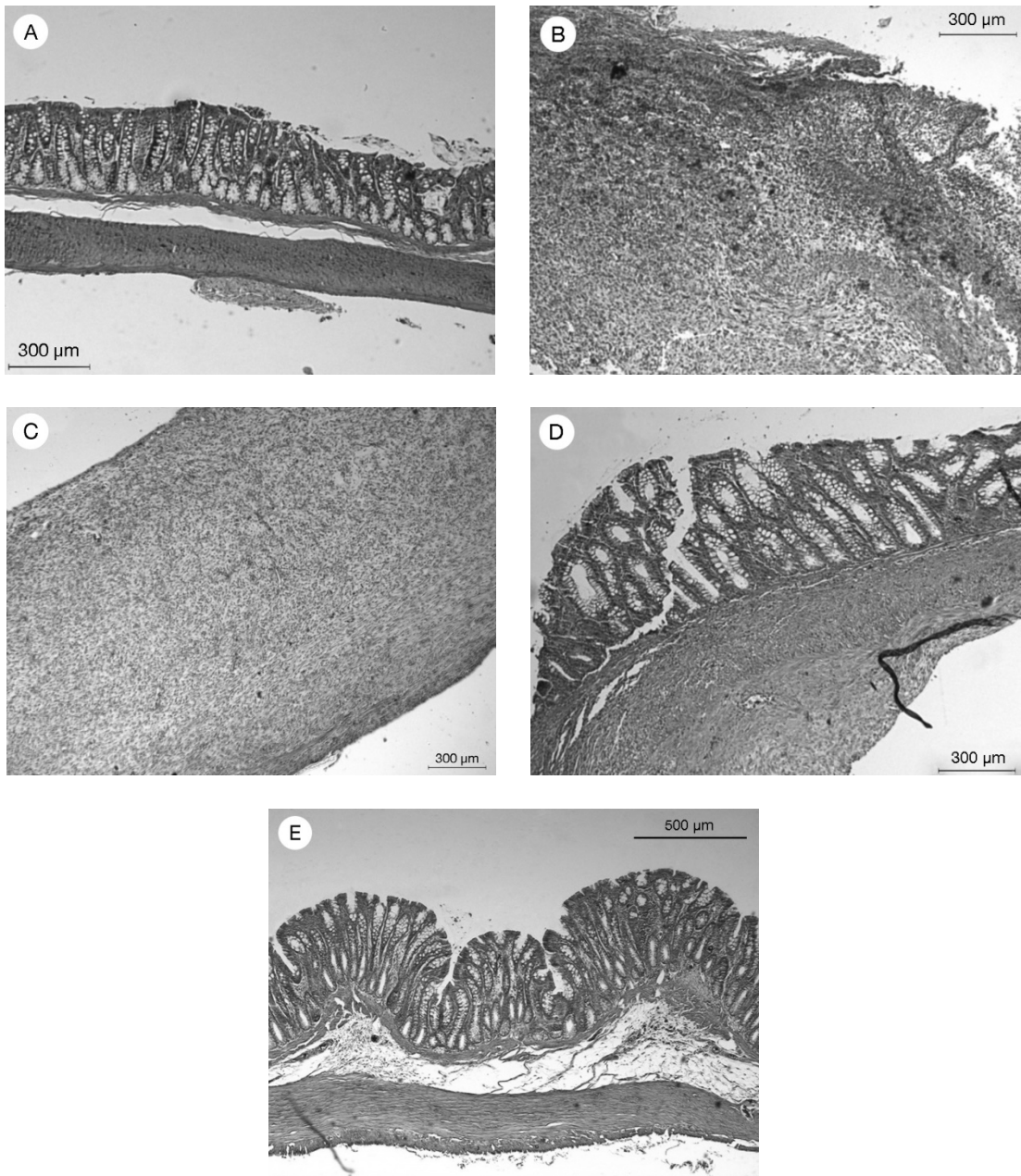


FIGURA 7



②① N.º solicitud: 201830512

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.05.2018

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TERUEL ADRIÁN H. Y COL. Functional Magnetic Mesoporous Silica Microparticles Capped with an Azo-Derivative: A Promising Colon Drug Delivery Device. <i>Molecules</i> , 10.02.2018, Vol. 23, Páginas 1-13, ISSN 1420-3049 (Electronic), <DOI: doi: 10.3390/molecules23020375>. Todo el documento, en especial página 11, "Conclusions"; páginas 2-3.	1-8, 11-16
X	MAS NURIA et al. Enzyme-responsive silica mesoporous supports capped with azopyridinium salts for controlled delivery applications. <i>Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)</i> Germany 21 Jan 2013. , 21/01/2013, Vol. 19, Páginas 1346 - 1356, ISSN 1521-3765 (Electronic), <DOI: doi:10.1002/chem.201202740 pubmed: 23225567>. todo el documento, en especial páginas 1347-1348, "Results and Discussion"; página 1354, "Experimental Section".	1-8, 11-16
A	POPOVA M et al. New method for preparation of delivery systems of poorly soluble drugs on the basis of functionalized mesoporous MCM-41 nanoparticles. <i>Microporous and Mesoporous Materials</i> 20141101 Elsevier nld. , 01/11/2014, Vol. 198, Páginas 247 - 255, ISSN 1387-1811 (print), <DOI: doi:10.1016/j.micromeso.2014.07.044>. todo el documento	1-16
A	GAREB BAHEZ et al. Development of a zero-order sustained-release tablet containing mesalazine and budesonide intended to treat the distal gastrointestinal tract in inflammatory bowel disease. <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> JUN 2016. , 31/05/2016, Vol. 103, Páginas 32-42, ISSN 0939-6411(print) ISSN 1873-3441(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ejpb.2016.03.018>. <p>todo el documento</p>	1-16
A	WO 2014037596 A1 (UNIV POLITECNICA DE VALENCIA UPV et al.) 13/03/2014, <p>todo el documento</p>	1-16
A	WO 2012117140 A1 (UNIV VALENCIA POLITECNICA et al.) 07/09/2012, todo el documento	1-16
A	WO 2012007623 A2 (UNIV VALENCIA POLITECNICA et al.) 19/01/2012, todo el documento	1-16

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
16.11.2018

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/51 (2006.01)

A61K31/655 (2006.01)

A61P1/00 (2006.01)

A61P1/04 (2006.01)

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL