

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 507**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2015 PCT/EP2015/000974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2015 E 15722448 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3151856**

54 Título: **Nanopartículas de quitosano cargadas con antígeno para inmunoterapia**

30 Prioridad:

06.06.2014 EP 14001974

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.04.2020

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**HANEFELD, ANDREA;
WEIGANDT, MARKUS;
WOLF, MICHAEL;
KNOLLE, PERCY;
SCHROEDER, MATTHIAS;
SCHERLIESS, REGINA;
WALDEN, PETER;
DIEDRICH, ANDREA;
STECKEL, HARTWIG y
BALEEIRO, RENATO BRITO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 754 507 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 de quitosano cargadas con antígeno para inmunoterapia

5 La presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden quitosano y un antígeno, por las cuales el quitosano tiene un grado de desacetilación del 90% y un peso molecular de desde 5 kDa hasta 80 kDa, a micropartículas que contienen tales nanopartículas y a un procedimiento para la preparación de tales partículas. Las partículas pueden usarse para la vacunación.

10 Hace más de 20 años, se encontró que los derivados de quitina, incluyendo quitosano, tienen actividad inmunoestimuladora. Esta actividad inmunoestimuladora, junto con las similitudes estructurales entre los derivados de la quitina y glucanos, una clase inmunoadyuvante de polisacáridos naturales, llevó a varios científicos a estudiar las capacidades adyuvantes del quitosano. Los estudios con quitosano y sus derivados se enfocaron en sus efectos sobre la respuesta inmunitaria cuando se acopla con otros adyuvantes.

15 Debido a sus propiedades mucoadhesivas, se ha explorado el quitosano como un adyuvante para la vacunación en la mucosa. Se cree que los mecanismos de mejora de vacuna por quitosano es debido tanto a la retención de la vacuna en las fosas nasales a través de la mucoadhesión como la abertura de uniones de células endoteliales para el transporte paracelular de la vacuna (Ilium *et al.* 2001 *Adv Drug Dev* 51(1-3):81-96).

También se ha explorado las propiedades de adyuvante del quitosano en formulaciones de vacuna subcutánea frente a enfermedades infecciosas y para vacunas contra el cáncer (In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations, R. Scherließ *et al.*, *Vaccine* 2013; Chitin, Chitosan, and Glycated Chitosan Regulate Immune Responses: The Novel Adjuvants for Cancer Vaccine, X. Li *et al.*, *Clin and Dev Immunol*, 2013)

20 También se han descrito vacunas particuladas en la bibliografía para tener propiedades adyuvantes (por ejemplo, Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter?, S. Xiang, *Methods*, 2006).

25 El documento US 2004/0037840 A1 (formulaciones terapéuticas de vacuna novedosas) da a conocer que puede inducirse las respuestas inmunitarias frente a los antígenos polipeptídicos mediante quitosano en mezcla con tal antígeno polipeptídico y da a conocer micropartículas como formulación preferida para esto. Lo más preferido es que las micropartículas tienen un diámetro de partícula medio entre 0,73 y 0,82 μm y que el quitosano tiene un peso molecular medio de desde aproximadamente 95.000 hasta aproximadamente 3.000.000 y un grado de desacetilación (DD) de al menos el 98%.

30 Cui Zhengrong *et al* (2001) *J Controlled Release*, 75(3):409-419, describen nanopartículas de quitosano y carboximetilcelulosa con un tamaño medio de 180-200 nm para su uso en inmunización, en las que el quitosano tiene un peso molecular de 102 kDa y se desacetila y en las que las nanopartículas contienen un antígeno.

A pesar de las formulaciones descritas en la técnica anterior hay una demanda continua por formulaciones adicionales, especialmente formulaciones que proporcionan una eficacia mejorada en comparación con la formulación existente. Por tanto, era un objeto de la presente invención proporcionar tales formulaciones.

35 De manera sorprendente, se ha encontrado por la presente invención que la respuesta inmunitaria inducida por nanopartículas de quitosano que contienen antígeno se aumenta drásticamente, si el quitosano de tales nanopartículas tiene un grado de desacetilación (DD) del 90% y un peso molecular de desde 5 kilodalton (kDa) hasta 80 kilodalton (kDa) y el antígeno es un péptido, y las nanopartículas tienen un tamaño medio de desde 200 nm hasta 400 nm y contienen un contraión que es carboximetilcelulosa, pirofosfato, heparina, ácido hialurónico o poli(ácido acrílico). Tal hallazgo está en contraste claro con la enseñanza de la técnica anterior, que enseña que el valor de DD de quitosano en las partículas debería ser preferiblemente lo más alto posible (al menos 98%) y que el quitosano debería tener preferiblemente un peso molecular medio en un rango, que es mucho mayor que los de las nanopartículas de la presente invención, que han demostrado proporciona un efecto aumentado. Por consiguiente, un objeto de la presente invención se refiere a nanopartículas que comprende quitosano y un antígeno, que se caracterizan porque el quitosano tiene un grado de desacetilación de aproximadamente el 90% y un peso molecular de desde 5 kDa hasta 80 kDa y el antígeno es un péptido, y que las nanopartículas tienen un tamaño medio de desde 200 nm hasta 400 nm y contienen un contraión que es carboximetilcelulosa, pirofosfato, heparina, ácido hialurónico o poli(ácido acrílico).

40 Tal como se usa en el presente documento, “un” o “una” debe significar uno o más. Tal como se usa en el presente documento cuando se usa junto con la palabra “comprendiendo,” las palabras “un” o “una” significan uno o más de uno. Tal como se usa en el presente documento “otro(a)” significa al menos un segundo o más. Además, a menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos singulares incluyen pluralidades y los términos plurales incluyen el singular.

45 El término “nanopartículas” tal como se usa en el presente documento se refiere a partículas que tienen un tamaño medio de menos de 1 μm . Las nanopartículas preferiblemente tienen una forma regular, tal como esferas, pero también pueden tener una forma irregular.

El término “micropartículas” tal como se usa en el presente documento se refiere a partículas que tienen un tamaño medio de más de 1 µm. Las micropartículas pueden tener una forma regular, tal como esferas, o una forma irregular. En una realización, las micropartículas se acumulan de nanopartículas y un excipiente que puede proporcionar cohesión suficiente de nanopartículas para formar micropartículas que tienen una estabilidad física suficiente requerida para su respectivo uso. Un excipiente adecuado puede ser, por ejemplo, un excipiente que tiene propiedades adhesivas, tales como, por ejemplo un azúcar o alcohol de azúcar.

El término “quitosano” tal como se usa en el presente documento se refiere a un polisacárido lineal compuesto por N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) y D-glucosamina (unidad desacetilada) unidas a β-(1-4) distribuidas aleatoriamente. El quitosano se produce comercialmente mediante desacetilación de quitina, que es un polisacárido de N-acetil-D-glucosamina. Diferentes quitosanos pueden caracterizarse por peso molecular, viscosidad y grado de desacetilación (DD) en comparación con quitina.

Además del quitosano sus derivados o análogos que pueden formar nanopartículas con un antígeno también pueden usarse para el objeto de la presente invención. Tales análogos o derivados pueden ser un quitosano modificado, cuando la modificación sirve para alterar las propiedades físicas, químicas o fisiológicas de los mismos. Un análogo de ese tipo puede formarse mediante adherencia no covalente debido a las interacciones electrostáticas y/o hidrófilas y/o hidrófobas o mediante unión covalente a quitosano. Los ejemplos de análogos incluyen, pero no se limitan a, quitosano modificado por haberse unido a eso, ligandos dirigidos específicos o no específicos y/o agentes de permeabilización de membrana y/o agentes endosomolíticos y/o señales de localización nuclear. Otros ejemplos se derivatizan quitina o quitosano o los análogos mencionados anteriormente, es decir quitosano o análogos O-acetilados y/o N-acetilados y/o N-trimetilatados. Las moléculas aniónicas (por ejemplo el adyuvante Poli (I:C) (ácido poliinosínico:policitidílico) pueden unirse al quitosano N-trimetilatado catiónico mediante interacción electrostática. Los compuestos basados en quitosano pueden reticularse de manera ventajosa, o bien naturalmente o bien por medio de agentes de reticulación o gelificación tales como glutaraldehído (Akbuga and Durmaz 1994 Int J de Pharm 111, 217-222 ; Aiedeh *et al* 1997 J. Microencapsul. 14, 567-576 ; Jameela, S.R. *et al* 1995 Biomaterials 16, 769-775), formaldehyde or alginate gelation (Liu, L.S. *et al* 1997 J. Control Rel. 43, 65-74; Alexakis, T. *et al* 1995. Appl. Biochem. Biotechnol. 50, 93-106; Polk A. *et al* 1994 J. Pharm. Sci. 83, 178-185).

El término “antígeno” tal como se usa en el presente documento se refiere a todo, o partes, de un polipéptido, péptido o hidrato de carbono, que puede provocar una respuesta inmunitaria celular y/o humoral en un vertebrado, preferiblemente un mamífero. En una realización, el antígeno es un polipéptido, o un péptido. En una realización adicional, se puede glicosilar el polipéptido o péptido.

El término “grado de desacetilación” (DD) tal como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de grupos amino libres en la molécula de quitosano en relación con el número máximo posible de grupos N-acetilo de una correspondiente molécula de quitina. El quitosano se prepara más comúnmente mediante desacetilación alcalina de quitina por la cual se retiran los grupos acetilo de las unidades de N-acetil-D-glucosamina de quitina dejando atrás grupos amino libres (-NH₂). Los métodos para la determinación del grado de desacetilación de quitosano se conocen ampliamente en la técnica e incluyen diversos métodos tales como prueba de ninhidrina, titulación potenciométrica lineal, espectroscopía de infrarrojo cercano, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, titrimetría de bromuro de hidrógeno, espectrometría infrarroja, y una primera espectrofotometría UV de derivadas (Khan T A, J Pharm Pharmaceut Sci 5(3): 205-212, 2002).

Se determinó el peso molecular promedio en peso (PM) mediante dispersión de luz estática (SLS) (Scherließ, R., Buske, S., Young, K., Weber, B., Rades, T. y Hook, S., In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations Vaccine 31 (2013) 4812-4819).

Se usa comúnmente SLS para determinar el PM de polisacáridos [Wu H. Correlations between the Rayleigh ratio and the wavelength for toluene and benzene. Chemical Physics 2010; 367: 44-7]. Se envía una luz láser en la muestra y se determina la luz dispersada. La intensidad de luz dispersada es proporcional al peso molecular (promedio en peso) y la concentración de polímero. Esta proporcionalidad se da por la ecuación de Rayleigh reducida [Mediciones del peso molecular con el sistema Zetasizer Nano: Nota de aplicación Malvern] (Ecuación 2)

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M} \right) + 2A_2C$$

Ecuación 2: Ecuación de Rayleigh, en la que K es una constante óptica, R_θ es la razón de Rayleigh, M es el peso molecular promedio en peso, A₂ es el segundo coeficiente del virial y C es la concentración de muestra.

Al usar la ecuación de Rayleigh en un gráfico de Debye, puede generarse un ajuste lineal de KC/R frente a C en el que la intercepción es igual al peso molecular inverso y la inclinación resultante es dos veces el segundo coeficiente del virial. Para determinar el peso molecular, se realizan mediciones de la dispersión de luz estática usando un sistema ZetaSizer Nano ZS (Malvern Inc., Malvern, RU). El sistema ZetaSizer Nano ZS es un aparato de dispersión de luz láser de ángulo único con un ángulo de 173 grados y un láser He-Ne (633 nm) como fuente de luz. Antes de cada medición de muestra, se determina la intensidad de la luz de fondo y se mide la retrodispersión de tolueno como patrón

- de dispersión con un valor de razón de Rayleigh de $1,35 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$. Se disuelven las muestras en acetato de sodio 0,02 M y cloruro de sodio 0,1 M a un valor de pH de 4,5 y se supone un aumento del índice de refracción (dn/dc) de 0,192 mL/g (Nguyen S, Hisiger S, Jolicoeur M, Winnik FM, Buschmann MD. Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and ^1H NMR after semi-preparative SEC. Carbohydrate Polymers 2009; 75: 636-45). Se preparan y se miden cinco concentraciones de muestras diferentes en el rango de desde 0,25 hasta 1,00 g/L. Antes de cada medición, se filtran las muestras a través de un filtro de PTFE de 0,45 μm en una cubeta de vidrio cuadrada. Se realiza mediciones a una temperatura de 20°C, y se analizan datos a través del método del gráfico de Debye.
- Tal como se usa en el presente documento, “aproximadamente” se refiere a un valor numérico, incluyendo, por ejemplo, números enteros, fracciones, y porcentajes, si se indica de manera explícita o no. El término “aproximadamente” se refiere en general a un rango de valores numéricos (por ejemplo, +/- el 1-3% del valor recitado) que uno del experto habitual en la técnica consideraría equivalente al valor recitado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). En algunos ejemplos, el término “aproximadamente” puede incluir valores numéricos que se redondean a la figura significativa más cercana.
- A partir del documento US 2004/0037840 A1, que da a conocer partículas de quitosano para las formulaciones de vacuna terapéutica, se sabe que las partículas de la vacuna debería tener de manera más preferible un diámetro de partícula en el rango entre 0,73 y 0,82 μm (véase anteriormente). A diferencia, se ha encontrado por la presente invención que las nanopartículas de quitosano presentan un efecto inmunológico fuerte y superior si tienen un tamaño medio de desde 100 hasta 500 nm. Tal efecto inmunológico aumenta, si las nanopartículas tienen un tamaño de partícula medio de desde 200 nm hasta 400 nm, especialmente desde 200 nm hasta 300 nm.
- El término “tamaño medio” tal como se usa en el presente documento se refiere al diámetro promedio hidrodinámico (“z-promedio”) de la población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El z-promedio se define por ISO 22412 como el ‘diámetro de partícula promedio de intensidad armónica’. Para comparar los tamaños de z-promedio medidos mediante diferentes técnicas, las muestras tienen que ser monomodales (es decir sólo un pico), esféricas o casi esféricas en forma y monodispersas (es decir anchura de distribución muy estrecha). El tamaño medio de estos sistemas puede medirse mediante procedimientos estándares conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental (véase a continuación).
- De manera ventajosa, las nanopartículas de la presente invención contienen un contraión. Por tanto, una realización preferida de la invención se refiere a nanopartículas, que se caracterizan porque contienen un contraión según la reivindicación 1.
- El término “contraión” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo anión o un aniónico derivado de una sal orgánica que contrarresta la carga positiva del quitosano derivado por sus grupos amino protonado.
- La presente invención usa carboximetilcelulosa, tripolifosfato de pentasodio, heparina, ácido hialurónico de bajo PM, o poli(ácido acrílico) como contraión. Por consiguiente, la invención se refiere además a nanopartículas, que se caracterizan porque el contraión es carboximetilcelulosa, tripolifosfato de pentasodio, heparina, ácido hialurónico, o poli(ácido acrílico).
- Las nanopartículas contienen de manera ventajosa un péptido como antígeno. Por tanto una realización preferida de la invención se refiere a nanopartículas, que se caracterizan porque el antígeno es un péptido.
- El término “péptido” tal como se usa en el presente documento se refiere a una cadena de al menos dos aminoácidos unidos a un otro mediante un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un péptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales se une a otros a modo de al menos un enlace peptídico. El término “péptido” a veces incluye aminoácidos “non-naturales” u otras entidades que sin embargo pueden integrar en una cadena polipeptídica. El término “péptido” abarca el término “polipéptido”, que tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena peptídica no ramificada, larga y continua que contiene aproximadamente de 10 a aproximadamente 100 aminoácidos o más.
- Los péptidos y polipéptidos pueden contener l-aminoácidos, d-aminoácidos, o ambos y pueden contener cualquiera de una variedad de modificaciones de aminoácidos o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación, amidación, metilación terminal, etc. En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos, y combinaciones de los mismos.
- A pesar del efecto adyuvante del quitosano, en una realización de la invención las nanopartículas pueden contener además un adyuvante.
- El término “adyuvante” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que puede potenciar la respuesta inmunitaria frente a un antígeno. Si se combina con un antígeno y un adyuvante tal combinación induce a una respuesta inmunitaria frente al antígeno, que es más fuerte que la inducida por antígeno solo. Ejemplos de adyuvantes que pueden usarse son CpG, CTB, c-di-AMP, Poli IC, agonistas del receptor RIG-I basado en ARN, o citocinas.

Las nanopartículas pueden usarse para la vacunación incluyendo vacunación preventiva y terapéutica. Por tanto, la invención también se refiere a nanopartículas para su uso en la vacunación. Las realizaciones específicas de la invención son nanopartículas para su uso como vacuna terapéutica así como a nanopartículas para su uso como vacuna preventiva. Se prefiere especialmente el uso de las nanopartículas para vacunación terapéutica.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “vacuna” tal como se usa en el presente documento se refiere a una formulación farmacéutica terapéutica o profiláctica que contiene un componente frente al cual se induce a un huésped vacunado para aumentar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora. Preferiblemente, un componente de ese tipo que induce a una respuesta inmunitaria es un antígeno.

10 El término “terapéutico” junto con “vacuna” tal como se usa en el presente documento se refiere a que la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna trata, mejora o disminuye una enfermedad en curso, tal como, por ejemplo, cáncer, tras su aparición o detección. El término “vacunación terapéutica” tal como se usa en el presente documento se refiere al uso de una vacuna terapéutica para el tratamiento, mejora o disminución de una enfermedad en curso, tal como SIDA, tuberculosis, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo esclerosis múltiple y artritis reumatoide), úlceras gástricas o cáncer.

15 El término “preventivo” junto con “vacuna” tal como se usa en el presente documento se refiere a que la respuesta inmunitaria se induce por la vacuna en un sujeto no infectado para proporcionar protección frente a una enfermedad inducida por infección microbiana o viral o para reducir la gravedad de la invasión microbiana. El término “vacunación preventiva” tal como se usa en el presente documento se refiere al uso de una vacuna preventiva para inducir a una respuesta inmunitaria en un sujeto no infectado para proporcionar protección frente a una enfermedad inducida por
20 infección microbiana o viral o para reducir la gravedad de la invasión microbiana.

Según una realización particularmente preferida de la presente invención las nanopartículas son para su uso de vacunación terapéutica, preferiblemente para vacunación contra el cáncer. Asimismo la presente invención también se refiere al uso de nanopartículas para la vacunación terapéutica, preferiblemente para la vacunación contra el cáncer y la vacunación contra enfermedades autoinmunitarias

25 En caso de vacunación contra el cáncer las nanopartículas deben contener un antígeno tumoral apropiado. Las nanopartículas para la vacunación contra el cáncer deben (i) incluir secuencias peptídicas que se unen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, (ii) procesarse por células tumorales y se vuelven disponibles para unirse a moléculas del MHC I, (iii) reconocerse por el repertorio de células T en un MHC I de forma restringida, y (iv) conducir la expansión de precursores de linfocitos T citotóxicos (CTL) que expresan receptores de células T
30 específicos (Matera L, Cancer Treat Rev 36(2): 131-141, 2010).

Puesto que la clonación molecular del primer gen notificó que codifica un antígeno tumoral humano definido por CTL
MAGE (antígeno asociado a melanoma), y con el desarrollo de nuevas tecnologías, se han identificado y caracterizado muchos otros antígenos reconocidos por las células T en los cánceres humanos, los denominados antígenos
35 asociados con tumor (TAA), (Van der Bruggen *et al.*, J Immunol 178(5): 2617-2621, 2007; Novellino L *et al.*, Cancer Immunol Immunother 54(3): 187-207, 2005). Otros ejemplos de TAA son CEA (antígeno carcinoembrionario), CA-125 (antígeno del cáncer 125), MUC-1 (Mucina 1), ETA (antígeno tumoral epitelial) y CTAG1B (antígeno del cáncer/testículo 1b).

Las nanopartículas de la presente invención pueden administrarse mediante diversas vías tales como vía mucosa o
40 vía parenteral, tal como vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa. Tal como se usa en el presente documento, el término “mucosa” se refiere a cualquier superficie de membrana del cuerpo cubierto por mucosa, tales como la mucosa nasal, pulmonar, oral (sublingual, bucal), gastroentérica, rectal, urinaria, conjuntiva, glandular, por ejemplo glándula mamaria, epitelial. Por consiguiente, una realización de la invención se refiere al uso de las nanopartículas para la vacunación que se caracteriza porque las nanopartículas se administran mediante
45 administración en la mucosa o mediante inyección parenteral. Preferiblemente, las nanopartículas se administran mediante vía mucosa, por la cual se prefiere especialmente la vía nasal y pulmonar. Por tanto, una realización preferida se refiere al uso de las nanopartículas para la vacunación que se caracteriza porque la administración en la mucosa es la administración pulmonar o nasal.

La administración en la mucosa de las nanopartículas puede realizarse usando dispersiones líquidas y dispositivos
50 conocidos en la técnica. La administración de la dispersión de nanopartículas líquida puede realizarse con rangos de tamaño de partícula controlados, que se adaptan a la vía de administración específica, usando dispositivos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la dispersión de nanopartículas puede administrarse a la mucosa nasal usando bombas mecánicas o pulverizadores. La administración en la mucosa pulmonar puede lograrse, por ejemplo, mediante nebulización de la dispersión de nanopartículas a los pulmones usando inhaladores de dosis medidas presurizados (pMDI) disponibles comercialmente. Preferiblemente las dispersiones líquidas usadas para la administración de las
55 nanopartículas en la mucosa son dispersiones acuosas en las que las nanopartículas se dispersan en una disolución acuosa.

Se pueden preparar las nanopartículas de quitosano mediante diversos métodos que se conocen por un experto en la técnica tal como el método de gelificación iónica, emulsificación y reticulación, coalescencia de gotas de emulsión,

5 difusión de disolventes de emulsión, micelización inversa, gelificación iónica, complejación de polielectrolitos, gelificación iónica modificada con polimerización por radicales, desolvatación (*A. Grenha, Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods, J Drug Targeting, 2012*). Se prefiere el método de gelificación iónica ya que es muy simple y suave e ya que implica la reticulación física reversible mediante interacción electrostática en lugar de reticulación química, que evita la posible toxicidad de reactivos y otros efectos no deseados. De manera ventajosa, las nanopartículas pueden prepararse en condiciones leves sin usar disolventes nocivos, especialmente disolventes orgánicos, que pueden provocar la degradación del antígeno como puede ser el caso si es un antígeno del péptido que es inestable y sensible a otros entornos del procedimiento.

10 El término "gelificación iónica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a complejación entre moléculas cargadas de manera opuesta para preparar nanopartículas. En una realización del método de gelificación iónica se disuelve el quitosano en un medio acuoso, que es preferiblemente un ácido débil para fomentar la conversión de grupos de aminoácido (-NH₂) libres en su forma protonada cargada positivamente (-NH₃⁺). Entonces se combina tal disolución con una disolución acuosa que contiene contraiones cargados negativamente, por ejemplo mediante la adición de una disolución acuosa que contiene quitosano a una disolución acuosa que contiene contraiones cargados negativamente o vice versa. Preferiblemente, se realiza la combinación de disoluciones acuosas mediante adición gota a gota de una disolución acuosa a la otra con agitación constante. Debido a la complejación entre las especies cargadas de manera opuesta, el quitosano experimenta gelificación iónica y precipita para formar partículas esféricas. Las nanopartículas pueden retirarse mediante filtración, lavarse con agua destilada y secarse. Por consiguiente, una realización preferida de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las nanopartículas, que se caracteriza porque las nanopartículas se preparan mediante gelificación iónica.

15 El término "disolución acuosa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier disolución o suspensión, en la que al menos algo del disolvente presente consiste en agua. Los constituyentes del disolvente adicional que pueden estar presentes son alcoholes, tales como, por ejemplo, etanol, propanol, propanediol o glicerol. La disolución acuosa preferiblemente comprende agua o una mezcla de etanol/agua como disolvente, el disolvente particularmente consiste de manera preferible en agua. En determinadas realizaciones la disolución acuosa comprende un agente de modificación del pH, tal como un ácido, una base o una sustancia tampón. En una realización preferida la disolución acuosa contiene un agente que proporciona un pH de ácido débil, tal como un tampón de ácido acético / acetato.

20 Un procedimiento apropiado para la preparación de las nanopartículas comprende las etapas de (a) preparar una disolución acuosa que comprende quitosano y un antígeno; (b) preparar una disolución acuosa que comprende un contraión; (c) mezclar la disolución acuosa preparada en la etapa (a) y la disolución acuosa preparada por la etapa (b); (d) agitar la mezcla obtenida en la etapa (c) para producir una dispersión acuosa que contiene nanopartículas de quitosano; (e) recoger las nanopartículas obtenidas en la etapa (d).

25 Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de las nanopartículas, que comprende las etapas:

30 (a) preparar una disolución acuosa que comprende quitosano y un antígeno;

(b) preparar una disolución acuosa que comprende un contraión;

(c) mezclar la disolución acuosa preparada en la etapa (a) y la disolución acuosa preparada por la etapa (b);

35 (d) agitar la mezcla obtenida en la etapa (c) para producir una dispersión acuosa que contiene nanopartículas de quitosano;

(e) recoger las nanopartículas obtenidas en la etapa (d).

40 Según una realización alternativa del procedimiento el antígeno está presente en la disolución acuosa que comprende el contraión (etapa (b)) en lugar de la disolución acuosa que comprende quitosano (etapa (a)). Según una realización alternativa adicional del procedimiento el antígeno está presente tanto en disoluciones acuosas, es decir en la disolución acuosa que comprende quitosano (etapa (a)) como en la disolución acuosa que comprende el contraión (etapa (b)).

45 Preferiblemente, se realiza la mezcla de disoluciones acuosas en la etapa (c) de tal procedimiento mediante la adición de la disolución acuosa preparada en la etapa (b) a la disolución acuosa preparada por la etapa (a). Por consiguiente, la invención también se refiere a un procedimiento de preparación de nanopartículas, en el que se realiza la etapa (c) mediante la adición de la disolución acuosa preparada en la etapa (b) a la disolución acuosa preparada por la etapa (a).

50 Tal como se describió anteriormente las nanopartículas de la presente invención pueden usarse de manera ventajosa para la vacunación, por las cuales la administración en la mucosa, especialmente la administración pulmonar y nasal, es una vía de administración preferida. Debido a su tamaño de partícula pequeño tales nanopartículas no se pueden administrar directamente de manera apropiada y requieren deben dispersarse en un medio líquido, especialmente un medio acuoso, que pueden tener un efecto perjudicial sobre la estabilidad de las nanopartículas durante el

almacenamiento. Por ejemplo, la administración pulmonar directa de las nanopartículas muy pequeñas sin un medio líquido que proporciona un tamaño de partícula apropiado da como resultado su exhalación de modo que no se induce a una respuesta inmunitaria de la mucosa pulmonar. Las formulaciones de partículas secas que contienen las nanopartículas, que tienen un tamaño de partícula que pueden usarse para la administración directa, son altamente
5 deseadas. Tras administrarse a y en contacto con la mucosa, las partículas de manera ventajosa liberarán las nanopartículas, por ejemplo mediante su disgregación.

Por tanto, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar partículas que comprenden las nanopartículas de esta invención. Tales partículas se proporcionan por micropartículas que comprenden las nanopartículas de la presente invención y un agente de matriz.

10 El término "agente de matriz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente o compuesto químico que es al menos parcialmente soluble en agua y medios acuosos ya que están presentes en la mucosa, tal como mucosa alveolar y nasal, y que puede proporcionar la matriz y/o la adherencia de las nanopartículas a una otra para formar partículas mayores. En las micropartículas formadas con el agente de matriz, las nanopartículas pueden disponerse como aglomerados y/o pueden estar completa y/o parcialmente rodeadas por el agente de matriz. Tras el
15 contacto de las micropartículas con el agua o medios acuosos, el material de la matriz se disuelve parcial o totalmente en tales medios que conducen a disgregación de las micropartículas y la liberación de las nanopartículas contenidas en el mismo.

Los agentes de matriz preferidos son monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar o polisacáridos. Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere a micropartículas, que se caracterizan porque el
20 agente de matriz es un monosacárido, un disacárido, un alcohol de azúcar o un polisacárido.

Los agentes de matriz particularmente preferidos son la monosacárido glucosa, los disacáridos trehalosa, sacarosa y lactosa, los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol, y los polisacáridos almidón y dextrano. Por tanto, la invención se refiere además a micropartículas que comprenden las nanopartículas, que se caracteriza porque el monosacárido del agente de matriz es glucosa, el disacárido del agente de matriz es trehalosa, sacarosa o lactosa, el alcohol de azúcar del agente de matriz es manitol o sorbitol, y el agente de matriz polisacárido es almidón o dextrano.
25

En la administración pulmonar, el tamaño de las partículas activas es de gran importancia en la determinación del sitio de la absorción. Con el fin de lograr que las partículas se transportan profundamente en los pulmones, las partículas deben tener un tamaño particular, por ejemplo debe tener un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de menos de 10 μm . Es probable que las partículas que tienen un MMAD mayor que 10 μm impacten en las paredes de la garganta y en general no alcancen el pulmón. En general se pueden considerar que las partículas con un MMAD mayor que 10 μm se depositan en la orofaringe, aquellas que miden entre 5 y 10 μm en las vías aéreas centrales y aquellas desde 0,5 hasta 5 μm en las vías aéreas pequeñas y alveolos. Por tanto, para el tratamiento respiratorio (inhalación) se prefiere usar partículas con un MMAD entre 0,5 y 5 μm .
30

El término "diámetro aerodinámico mediano de masa" (abreviado como MMAD), tal como se usa en el presente documento, es una medición del tamaño aerodinámico de una partícula dispersada. La distribución de MMAD define la manera en la que un aerosol deposita durante la inhalación, y es el diámetro mediano de una partícula de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de sedimentación, en general en el aire, como la partícula. El MMAD abarca la forma de la partícula, densidad y tamaño físico de una partícula y se refiere al punto medio o mediano de la distribución del tamaño de partícula aerodinámico de un polvo aerosolizado determinado por el impacto de la cascada de Anderson o el impactador de próxima generación (NGI). En los estudios se usó el impactador farmacéutico de próxima generación Modelo 170 (NGI), que es un impactador de cascada de clasificación de partículas de alto rendimiento, precisión para someter a prueba dispositivos inhaladores de dosis medida, polvo seco y similares. MSP Corporación desarrolló este impactor junto con un consorcio de 15 miembros de empresas farmacéuticas (*Next Generation Impactor Consortium*). La participación del usuario sustancial en el proceso de diseño ha dado como resultado una combinación de principios de diseño aerodinámico y una operación fácil de usar. Un conjunto extraíble de copas de recogida minimiza el tiempo entre pruebas de inhaladores. Otras características que ahorran tiempo incluyen la ausencia de un filtro final y de juntas tóricas de entrada. Se ha sometido a prueba el NGI por 15 empresas farmacéuticas en el consorcio del impactador de próxima generación.
35
40
45

Una realización de la invención se refiere a micropartículas que tienen un MMAD de desde 0,5 μm hasta 8 μm , preferiblemente desde 0,5 μm hasta 5 μm , más preferiblemente desde 1 μm hasta 5 μm y lo más preferiblemente desde 2 μm hasta 5 μm . Por consiguiente, la invención también se refiere a micropartículas, que se caracterizan porque tienen un diámetro aerodinámico mediano de masa de desde 0,5 μm hasta 5 μm , preferiblemente desde 1 μm hasta 5 μm y más preferiblemente desde 2 μm hasta 5 μm .
50

Las micropartículas pueden usarse para la vacunación. Por tanto, una realización de la invención se refiere a nanopartículas para su uso en la vacunación.
55

Según una realización preferida de la presente invención las micropartículas son para su uso en la vacunación terapéutica, preferiblemente para la vacunación contra el cáncer. Asimismo la presente invención también se refiere al uso de micropartículas para la vacunación terapéutica, preferiblemente para la vacunación contra el cáncer.

- 5 Junto a las diversas vías de administración adicionales tal como se describió anteriormente para las nanopartículas, las micropartículas se administran preferiblemente mediante la administración en la mucosa, más preferiblemente mediante administración pulmonar o nasal, por la cual la administración pulmonar es la más preferida. Por tanto, una realización preferida se refiere al uso de las micropartículas para la vacunación terapéutica que se caracteriza porque la administración en la mucosa es administración pulmonar o nasal.
- 10 Para la administración en la mucosa pueden administrarse las micropartículas, por ejemplo, usando dispositivos tales disponibles comercialmente como inhaladores de dosis medidas presurizados (pMDI) o inhaladores de polvo seco (IPS). Si se administra en la mucosa pulmonar se prefieren inhaladores de polvo seco. IPS disponibles comercialmente son, por ejemplo, Puffhaler (Aktiv-Dry LLC), TwinCaps (Hovione LLC), Torus DPI (Manta Devices LLC) the Conix One (3M) y DirectHaler Pulmonary (Direct-Haler A/S), Cyclohaler (PB Pharma GmbH).
- 15 Las micropartículas pueden prepararse usando la técnica de secado por pulverización. El término “secado por pulverización”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un método de producción de un polvo seco que comprende partículas micrónicas a partir de una disolución o suspensión usando un secador por pulverización. El secado por pulverización es, en principio, un procedimiento de extracción de disolvente. Los constituyentes del producto que va a obtenerse se disuelven/dispersan en un líquido y entonces se alimentan, por ejemplo usando una bomba peristáltica, a un atomizador de un secador por pulverización. Un atomizador adecuado que puede usarse para la atomización del líquido, incluyen boquillas o discos rotativos. Con boquillas, la atomización se produce debido a la acción del gas comprimido, mientras que en el caso de usar discos rotativos la atomización se produce debido a la rápida rotación del disco. En ambos casos, la atomización conduce a la ruptura del líquido en pequeñas gotas en la cámara de secado, en la que se extrae el disolvente de las gotas de aerosol y se descarga, por ejemplo a través de un tubo de escape a una trampa de disolvente.
- 20 Los tamaños de gotas de desde 10 hasta 500 μm pueden generarse mediante secado por pulverización. A medida que el disolvente (agua o disolvente orgánicos) se seca, las gotas que contienen nanopartículas se secan en una partícula micrónica, formando partículas similares a polvo.
- 25 Se pueden usar varias máquinas de secado por pulverización disponibles comercialmente para preparar las micropartículas de la invención, por ejemplo, se fabrican máquinas adecuadas por Buchi y Niro. Los ejemplos de secadores por pulverización adecuados incluyen secadores por pulverización a escala de laboratorio Buchi, tal como el Mini Spray Dryer 290, o un MOBILE MINOR™, o un Pharma Spray Dryer PharmaSD® de Niro, o un 4M8-TriX de Procept NV.
- 30 En una máquina de secado por pulverización típica, la suspensión que va a secarse se bombea desde un depósito con agitación hasta una cámara de atomización donde se pulveriza desde una boquilla como gotas finas (preferiblemente las gotas están en el rango de 1 a 20 μm en diámetro) en una corriente de aire caliente, por ejemplo, temperaturas de entrada en el rango de 50 a 150°C (puede usarse nitrógeno en lugar de aire si hay un riesgo de oxidación no deseada del antígeno). La temperatura del aire caliente debe ser suficiente para evaporar el líquido y secar las micropartículas hasta un polvo que fluye libremente pero no debe ser tan alta para degradar el principio activo. Las micropartículas pueden recogerse en un ciclón o un filtro o una combinación de ciclones y filtros.
- 35 Las técnicas de secado por pulverización adecuadas, que pueden usarse para la preparación de las micropartículas, se conocen bien y se describen, por ejemplo, por K. Masters en “Spray-drying Handbook”, John Wiley & Sons, Nueva York, 1984. En una realización preferida, la atomización del líquido se realiza usando una boquilla.
- 40 Según una realización apropiada de la invención, un líquido que contiene las nanopartículas de la presente invención y el agente de matriz se seca por pulverización. Por tanto, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de micropartículas, que se caracteriza porque un líquido que contiene las nanopartículas y el agente de matriz se seca por pulverización. El líquido preferiblemente es una disolución acuosa, en la que se disuelve el agente de matriz y se dispersan las nanopartículas.
- 45 Preferiblemente el procedimiento comprende las etapas (a) preparar una dispersión acuosa que comprende las nanopartículas cargadas con antígeno y el agente de construcción de matrices que se disuelve en la misma; (b) secar por pulverización la dispersión acuosa preparada en la etapa (a) para producir micropartículas que contienen nanopartículas cargadas con antígeno y (c) recoger las micropartículas obtenidas en la etapa (b). Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento, que se caracteriza porque comprende las etapas
- 50 (a) preparar una dispersión acuosa que comprende las nanopartículas cargadas con antígeno y el agente de construcción de matrices que se disuelve en la misma;
- (b) secar por pulverización la dispersión acuosa preparada en la etapa (a) para producir micropartículas que contienen nanopartículas cargadas con antígeno y
- 55 (c) recoger las micropartículas obtenidas en la etapa (b). El término “cargado con antígeno” junto con “nanopartículas” se refiere a nanopartículas que comprenden un antígeno tal como se describe y/o se reivindica por la presente invención.

Si se pretende que las micropartículas que van a administrarse usando inhaladores de polvo seco, puede mezclarse un material excipiente particulado a las micropartículas para mejorar el flujo del polvo. Tales partículas de material excipiente puede ser grueso, por ejemplo teniendo un diámetro aerodinámico mediano de masa mayor que 90 µm (tales partículas gruesas se denominan partículas portadoras) o pueden ser finas.

- 5 Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Análisis del tamaño de partícula de nanopartículas

- 10 Las medidas de tamaño de partícula y potencial zeta se realizan usando un Zetasizer (Malvern Instruments) que aplica dispersión de luz dinámica (DLS). Para el análisis de datos, el modo de análisis de "propósito general" se usa basándose en los siguientes parámetros:

Viscosidad: 1,01 mPas (a 22°C)

Índice de refracción: 1,328

Cada muestra se equilibra a 22°C en el plazo de 120 segundos y se realiza análisis por triplicado.

- 15 Se realizan mediciones del potencial zeta usando células específicas. Se realizan mediciones por triplicado también, usando 10-100 ejecuciones (ajuste automático). Los análisis de datos se basan en el modelo Smoluchowski.

Análisis del tamaño de partícula de micropartículas

La distribución del tamaño de partículas del producto secado por pulverización se realiza usando un difractor láser HELOS (Sympatec GmbH, Clausthal, Zellerfeld, Alemania). Se dispersa el polvo secado por pulverización usando 3 bares y se mide usando el módulo HELOS Rodus.

- 20 El inhalador basado en cápsulas 'Cyclohaler' se usa para la caracterización aerodinámica. Las mediciones se realizan utilizando el módulo inhalador HELOS. Se usa un caudal del aire de 100 l/min (=caída de presión diferencial de 4 kPa a través del inhalador) para liberar el polvo desde el inhalador. La distribución de tamaño de partícula se determina mediante difracción láser. Se dispersan las cápsulas de HPMC (tamaño 3) rellenas con 10 mg de polvo secado por pulverización usando el inhalador. Se determinan X50, la fracción de polvo < 5,25 µm así como la desaglomeración relativa.
- 25

Preparación de nanopartículas (descripción general)

Las nanopartículas se fabrican por gelificación iónica. Las nanopartículas se forman espontáneamente por reticulación iónica por interacción electrostática de los grupos amino primarios cargados positivamente de quitosano con los grupos carboxilo cargados negativamente del derivado de celulosa.

- 30 Para la preparación de una disolución de quitosano se disuelve una cantidad precisa de quitosano (Chitoscience, Heppel Medical Chitosan), por ejemplo el 0,1%, en una disolución de ácido acético, por ejemplo el 2%. La disolución de carboximetilcelulosa se prepara disolviendo una cantidad precisa de Tylose C30 (Hoechst), por ejemplo el 0,1%, en agua purificada y se añade lentamente a la fase de quitosano mientras se agita sobre un agitador magnético. Las nanopartículas resultantes (con las razones quitosano/ácido acético/Tylose al 0,1/2 y 0,1%) tienen un tamaño medio de 230 nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0,140 (medido por Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Las nanopartículas se muestrean mediante centrifugación y se resuspenden en ácido acético al 1%. Por consiguiente, se preparan las formulaciones que contienen diferentes contraiones (por ejemplo, ejemplos con heparina, ácido hialurónico y poliacrilato), se disuelven los contraiones en agua purificada.
- 35

La composición de la suspensión de la nanopartícula final es tal como sigue:

40

Excipiente	Partes
Quitosano	0,05
Carboximetilcelulosa	0,05
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	99,99

ES 2 754 507 T3

Excipiente	Partes
Quitosano	0,01
Carboximetilcelulosa	0,01
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,98

Excipiente	Partes
Quitosano	0,1
Carboximetilcelulosa	0,1
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,8

Excipiente	Partes
Quitosano	0,25
Carboximetilcelulosa	0,25
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,5

Excipiente	Partes
Quitosano	0,25
Carboximetilcelulosa	0,25
Ácido acético al 99%	2,5
Agua purificada	97,0

Excipiente	Partes
Quitosano	0,25
Carboximetilcelulosa	0,25
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,5

Excipiente	Partes
Quitosano	0,01
Carboximetilcelulosa	0,01
Ácido clorhídrico al 37%	0,01
Agua purificada	99,97

ES 2 754 507 T3

Excipiente	Partes
Quitosano	0,25
Carboximetilcelulosa	0,25
Ácido clorhídrico al 37%	0,3
Agua purificada	99,2

Excipiente	Partes
Quitosano	0,05
Carboximetilcelulosa	0,05
Ácido clorhídrico al 37%	0,02
Agua purificada	99,88

Excipiente	Partes
Quitosano	0,1
Pirofosfato	0,3
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,6

Excipiente	Partes
Quitosano	0,1
Heparina	0,1
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,8

Excipiente	Partes
Quitosano	0,05
Heparina	0,05
Ácido acético al 99%	1
Agua purificada	98,9

Excipiente	Partes
-------------------	---------------

Quitosano	0,25
Ácido hialurónico	0,1
Ácido acético al 99%	0,1
Agua purificada	99,55

Excipiente	Partes
Quitosano	0,25
Ácido hialurónico	0,05
Ácido acético al 99%	0,1
Agua purificada	99,6

Excipiente	Partes
Quitosano	0,02
Poliácido acrílico	0,02
Ácido acético al 99%	0,1
Agua purificada	99,86

5 Las nanopartículas cargadas de ovoalbúmina se producen tal como sigue. Se disuelve el quitosano al 0,1% (p/v) (Hepe Medical Quitosano GmbH, Alemania) con ovoalbúmina 1 mg/ml (OVA; Sigma, EE.UU.) en ácido acético al 2% (V/V).

10 Se disuelve separadamente el 0,1% (p/v) de un derivado de celulosa cargado negativamente (Tylose C30, Hoechst, Alemania) como agente para gelificación iónica en agua doble destilada del mismo volumen y se añade lentamente a la fase de quitosano mientras se agita. Alternativamente se producen nanopartículas cargadas con ovoalbúmina tal como sigue. Se disuelve el quitosano al 0,1% (w/p) (Hepe Medical Quitosano GmbH, Alemania) (OVA; Sigma, EE.UU.) en ácido acético al 2% (V/V).

15 Se disuelve el 0,1% (p/v) de un derivado de celulosa cargado negativamente (Tylose C30, Hoechst, Alemania) como agente para gelificación iónica con ovoalbúmina 1 mg/ml separadamente en agua doble destilada del mismo volumen y se añade lentamente a la fase de quitosano mientras se agita. También puede disolverse ovoalbúmina en la fase de tilosa siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. La razón óptima de quitosano con respecto a tilosa que se determina es 1 : 1. La disolución de tilosa necesita añadirse a la disolución de quitosano para lograr el tamaño de partícula deseado.

Influencia del tamaño de partícula en su absorción por las células que presentan antígenos (macrófagos y células dendríticas)

20 Los macrófagos y células dendríticas usadas en este estudio se aíslan de la médula ósea de ratones C57BL/6j (Para el protocolo de aislamiento véase Schroder M. *et al.*, Mol Immunol. 2011, 48(9-10): 1139-48). En resumen, se aíslan las células de la médula ósea de las patas traseras de los ratones y se cultivan en medio RPMI complementado con FCS al 10%, penicilina 100 IU/ml, estreptomycin 100 µg/ml, β-mercaptoetanol 50 µM y o bien M-CSF 100 nM o bien GM-CSF 100 nM, para la diferenciación de macrófagos o células dendríticas respectivamente, en una incubadora humidificada (CO2 al 5% y 37°C) a una concentración celular de $0,8 \times 10^6$ células/ml en un placa de Petri sin tratar.

25 Para el procedimiento de diferenciación, se usa el sobrenadante de la línea celular R1 para producir sobrenadantes que contienen o bien GM-CSF o bien M-CSF y se mide la concentración con ELISA prior para usar en los experimentos. Tras cuatro días, se dividen las células 1 : 2 en placas de Petri adicionales y se cultivan durante tres días adicionales con medio de cultivo recién añadido y factores de crecimiento. Tras otros tres días, se usan las células adherentes para los experimentos *in vitro*, los análisis de FACS y los experimentos microscópicos. Para los estudios

30

de absorción de NP se siembran 5×10^4 macrófagos en un portaobjetos tratado con cultivo celular de 96 pocillos en un volumen de 100 μl (DMEM, FCS al 10%, penicilina 100 IU/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$). Entonces se añaden 100 $\mu\text{g/ml}$ o 1000 $\mu\text{g/ml}$ de NP de quitosano o NP de sílice con o sin fluorescencia para diferentes puntos de tiempo en 100 μl de medio de cultivo celular. Tras la fase de incubación se fragmentan las células, se lavan dos veces con PBS y se preparan para la citometría de flujo.

Se muestran los resultados experimentales en la figura 1 y 2: Absorción dependiente del tamaño de NP cargada con FITC o NP control sin carga de FITC por células que presentan de antígeno mieloides ($n=4$ como triplicado). Se muestra la media \pm DE de todos los tamaños de NP sometidos a prueba para quitosano y sílice para 0,1 mg/ml.

Además del quitosano, se han estudiado las nanopartículas de sílice y PLGA (todas marcadas con FITC) para determinar el tamaño de partícula preferido para la absorción por las células que presentan antígenos. Los resultados para la NP de sílice también se presentan aquí debido a que es técnicamente factible para fabricar estas partículas también en la escala micrométrica (al contrario de las partículas de quitosano). Los resultados para la NP de quitosano (y sílice) indican que la velocidad de absorción disminuye con tamaños de partículas superiores a 500 nm. El punto óptimo para el tamaño de partícula para la absorción favorable por células que presentan antígenos parece ser de 200-300 nm.

Métodos de pruebas inmunológicas

El cultivo celular véase anteriormente

Aislamiento de células T CD8+ (CTL)

Se aíslan T CD8 sin tratar del bazo de ratones OTI y se purifican mediante el instrumento autoMACS (Miltenyi Biotec). TRal contar las células se usan directamente para el co-cultivo *in vitro* con macrófagos o células dendríticas.

Citometría de flujo

La tinción de anticuerpos se realiza en presencia de bloqueo del receptor Fc (anticuerpo monoclonal 2,4G2 contra CD16-CD32 de ratón (10 $\mu\text{g/ml}$); preparado internamente) en tampón de citometría de flujo. Se usan los softwares FACSCanto II o Fortessa (BD Biosciences) y FlowJo (TreeStar) se usan para adquisición y análisis de datos. Se usa Hoechst 33258 (10 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) para la exclusión de células muertas.

Los anticuerpos usados para la citometría de flujo fueron tal como sigue (eBioscience): anti-CD69 conjugado con alofocianina o Alexa Fluor 488 (H1.2F3).

Experimentos in vitro

Para la evaluación *in vitro* de 5×10^4 quitosano-Ova-NP se usan macrófagos o células dendríticas en una placa de 96 pocillos tratada con cultivo celular en un volumen de 100 μl (DMEM, FCS al 10%, penicilina 100 IU/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$). Entonces se añaden 1×10^5 células T CD8+ OTI recién aisladas en 50 μl de medio y quitosano-Ova-NP u ovoalbúmina sin carga libre de la misma concentración en 50 μl de medio. Tras 24 h el sobrenadante, que se almacenó a -20°C para posteriores mediciones de ELISA, se aísla y se usan las células restantes para el análisis de citometría de flujo.

Mediciones de citocina

Se usa un ELISA específico de ratón para la detección de IL-2 (eBioscience) para los sobrenadantes generados *in vitro* y se usa Th1/Th2 10plex a base de perlas (FlowCytomix, eBioscience) para determinar las citocinas específicas de la célula T en el suero de muestras de sangre.

Los resultados experimentales se muestran en la figura 3: La comparación de NP de quitosano desacetilado de manera diferente. Media \pm DE de la expresión de CD69 dependiente de antígeno de las células T OTI y la producción de IL-2. El tamaño de NP para el quitosano es de 250 ± 30 nm. Se incubaron las células T OTI con la concentración de ovoalbúmina indicada o bien como control no unido (panel de ovoalbúmina) o bien cargada dentro de la NP del tipo de polímero indicado durante 24 h. Se detectó la expresión de CD69 por FACS, IL-2 mediante ELISA.

Se investigan las nanopartículas ($\sim 260\text{nm}$) hechas de quitosanos de diferentes grados de desacetilación (DD) para su rendimiento *in vitro* en entornos inmunológicos comunes (CD69, IL-2) usando ovoalbúmina como un antígeno modelo. Las nanopartículas de quitosano con un DD del 75 o el 95% muestran un efecto inmunológico aumentado en comparación con ovoalbúmina soluble, por el factor 10 en el caso de IL-2. Esta mejora está dentro del rango esperado resultante de la combinación de las propiedades adyuvantes de nanopartículas y quitosano. De manera sorprendente las nanopartículas de quitosano con un DD del 90% muestran un aumento drástico en respuesta inmunitaria (factor 38 en comparación con ovoalbúmina soluble para IL-2, véase la figura 3) en comparación con las mismas partículas con DD del 75 o el 95% que están opuestas al hallazgo de la técnica anterior. Los datos demuestran la respuesta inmunitaria superior de las partículas de la presente invención en comparación con las formulaciones de la técnica anterior y su utilidad para la vacunación terapéutica.

Preparación de micropartículas

Para obtener una formulación de polvo seco, se añade una matriz de manitol del 2% (p/v) (Pearlitol 200 SD, Roquette, Francia) a la suspensión de nanopartícula y se seca por pulverización usando el secador por pulverización Büchi B-290 Mini (Büchi, Flawil, Suiza) a una temperatura de entrada y salida de 80°C y 35°C, respectivamente.

5 Análisis de MMAD de micropartículas

Caracterización aerodinámica usando un impactador de próxima generación (NGI)

- 10 Para la caracterización aerodinámica, se carga las cápsulas de HPMC (tamaño 3) con 20 mg (\pm 0,1 mg) de polvo secado por pulverización. Se dispersan las cápsulas por el Cyclohaler. Se ajusta el caudal del aire a una caída de presión de 4 kPa a través del inhalador. La capacidad de vacío se ajusta a un flujo de 4 l para cada inhalación. Las diferentes fases del NGI se cubren con una mezcla de propilenglicol e isopropanol. Se usa una cápsula para cada ejecución. Tras cada ejecución, se limpian las partes del NGI con una cantidad definida de NaOH 0,1 M. El fluido de limpieza se transfiere a los tubos de ensayo y se incuba a 37°C hasta que de cómo resultado una disolución limpia. Se neutraliza esta disolución con HCl 0,1 M (razón de 1:1). Se determina el contenido en ovoalbúmina mediante el ensayo de BCA para cada fase del NGI. Basándose en los caudales usados, la se calculan la fracción de polvo fino (FPF), el diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y la desviación estándar geométrica (GSD) para el caudal usando el software CITDAS. Se muestran los resultados en la figura 4: Deposición de Ovoalbúmina (OVA) fuera de la formulación de micropartícula de polvo seco en el NGI dispersado del Cyclohaler a 100 L/min (n=3, las barras de error muestran la desviación estándar). El FPF es del 75,37% y el diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) es de 1,102 μ m. Esto indica una alta fracción de partículas que puede distribuir en el pulmón.
- 15
- 20 Se investigaron las micropartículas secadas por pulverización sobre su capacidad de liberar NP de quitosano cargada con OVA del tamaño inicial tras la dispersión en medios acuosos. Se muestran los resultados en la figura 5: el NP original antes del tamaño promedio del SD (línea negra) de 190,5 nm PDI 0,182; Tras el tamaño promedio de SD (línea gris) de 209,5 nm PDI 0,145 (SD: Secado por Pulverización, NP: Nanopartículas).
- 25 El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad del NP original y el tratado son similares. Esto indica que el secado por pulverización no altera el perfil de producto favorable de NP objetivo para la vacunación.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas que comprenden quitosano y un antígeno, caracterizadas porque el quitosano tiene un grado de desacetilación del 90% y un peso molecular de desde 5 kDa hasta 80 kDa y el antígeno es un péptido, y porque las nanopartículas tienen un tamaño medio de desde 200 nm hasta 400 nm y contienen un contraíón que es carboximetilcelulosa, pirofosfato, heparina, ácido hialurónico o poli(ácido acrílico).
2. Nanopartículas según la reivindicación 1, caracterizadas porque contienen un adyuvante.
3. Nanopartículas según las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso en la vacunación.
4. Nanopartículas según una o más de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la vacunación terapéutica, preferiblemente para vacunación contra el cáncer.
5. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 4 caracterizadas porque las nanopartículas se administran por administración en la mucosa o por inyección parenteral.
6. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 5, caracterizadas porque la administración en la mucosa es administración pulmonar o nasal.
7. Procedimiento para la preparación de nanopartículas según una o más de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las nanopartículas se preparan mediante gelificación iónica.
8. Procedimiento según la reivindicación 7 que comprende las etapas:
 - (a) preparar una disolución acuosa que comprende quitosano y un antígeno;
 - (b) preparar una disolución acuosa que comprende un contraíón;
 - (c) mezclar la disolución acuosa preparada en la etapa (a) y la disolución acuosa preparada por la etapa (b);
 - (d) agitar la mezcla obtenida en la etapa (c) para producir una dispersión acuosa que contiene nanopartículas de quitosano; y
 - (e) recoger las nanopartículas obtenidas en la etapa (d).
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa (c) se realiza mediante la adición de la disolución acuosa preparada en la etapa (b) a la disolución acuosa preparada por la etapa (a).
10. Micropartículas que comprenden nanopartículas según una o más de las reivindicaciones 1 ó 2 y un agente de matriz.
11. Micropartículas según la reivindicación 10, caracterizadas porque el agente de matriz es un monosacárido, un disacárido, un alcohol de azúcar o un polisacárido.
12. Micropartículas según la reivindicación 11, caracterizadas porque el monosacárido del agente de matriz es glucosa, el disacárido del agente de matriz es trehalosa, sacarosa o lactosa, el alcohol de azúcar del agente de matriz es manitol o sorbitol, y el polisacárido del agente de matriz es almidón o dextrano.
13. Micropartículas según una o más de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizadas porque las micropartículas tienen un diámetro aerodinámico mediano de masa de desde 0,5 μm hasta 5 μm , preferiblemente desde 1 μm hasta 5 μm y más preferiblemente desde 2 μm hasta 5 μm .
14. Micropartículas según una o más según la reivindicación 10 a 13 para su uso en la vacunación.
15. Micropartículas según una o más de las reivindicaciones 11 a 13 para su uso en la vacunación terapéutica, preferiblemente para la vacunación contra el cáncer.
16. Micropartículas para su uso según la reivindicación 15, caracterizadas porque las micropartículas se administran por administración en la mucosa.
17. Micropartículas para su uso según la reivindicación 16, caracterizadas porque la administración en la mucosa es administración pulmonar o nasal.
18. Procedimiento para la preparación de micropartículas según una o más de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque se seca por pulverización un líquido que contiene las nanopartículas según una o más de las reivindicaciones 1-2 y el agente de matriz.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque comprende las etapas:

(a) preparar una dispersión acuosa que comprende las nanopartículas cargadas con antígeno y el agente de matriz que se disuelve en la misma;

(b) secar por pulverización la dispersión acuosa preparada en la etapa (a) para producir micropartículas que contienen nanopartículas cargadas con antígeno; y

5 (c) recoger las micropartículas obtenidas en la etapa (b).

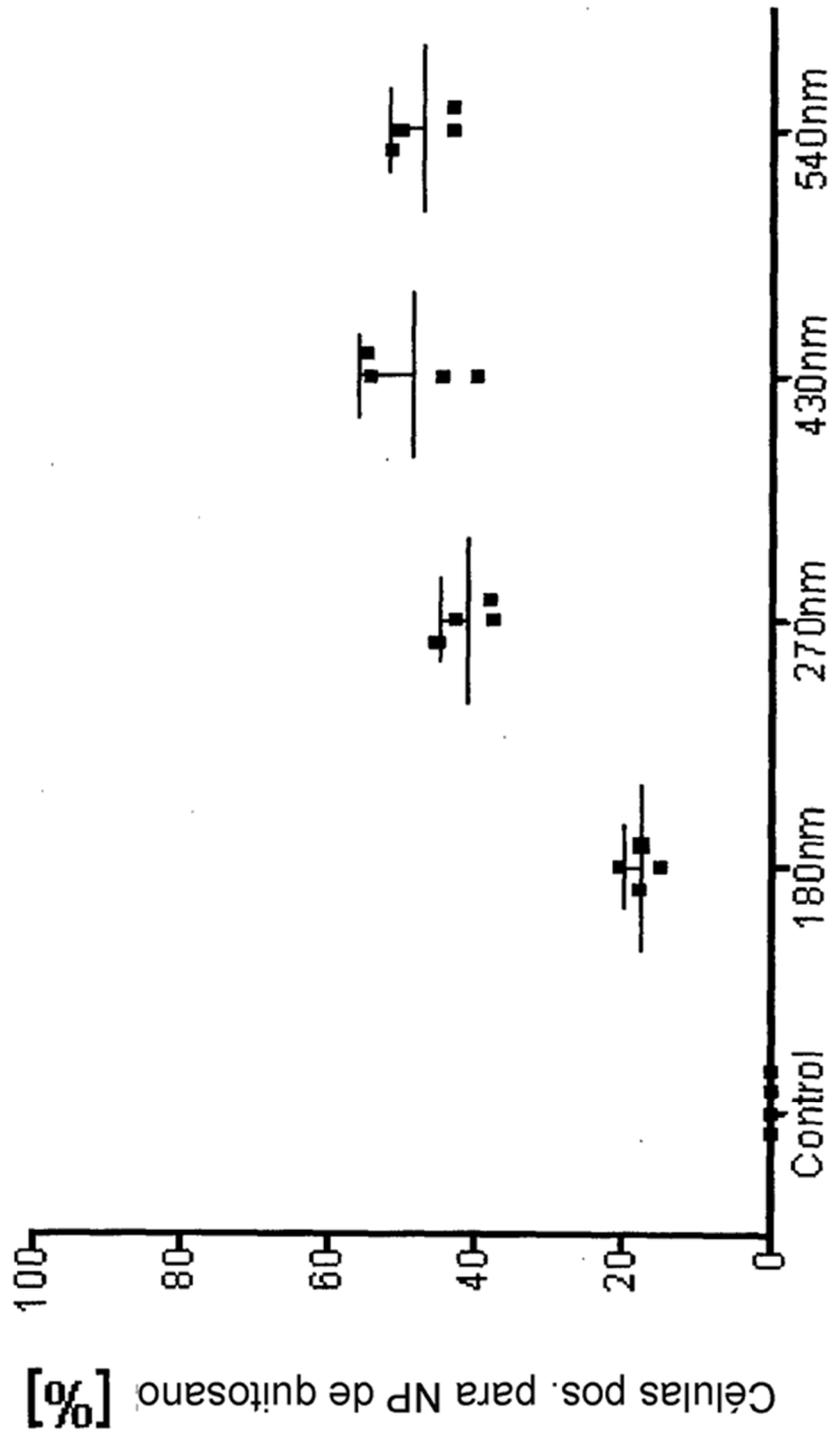


Figura 1

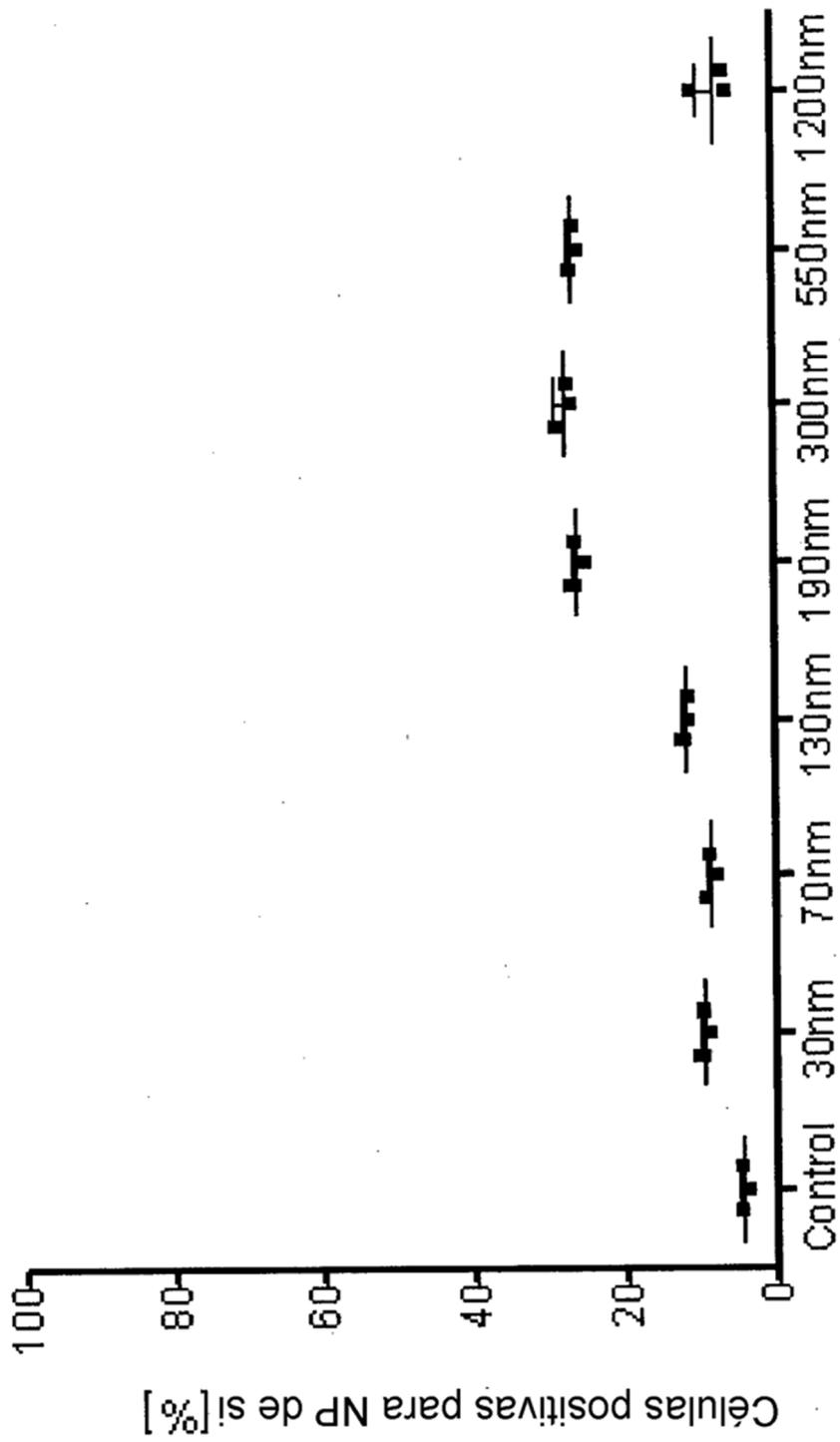


Figura 2

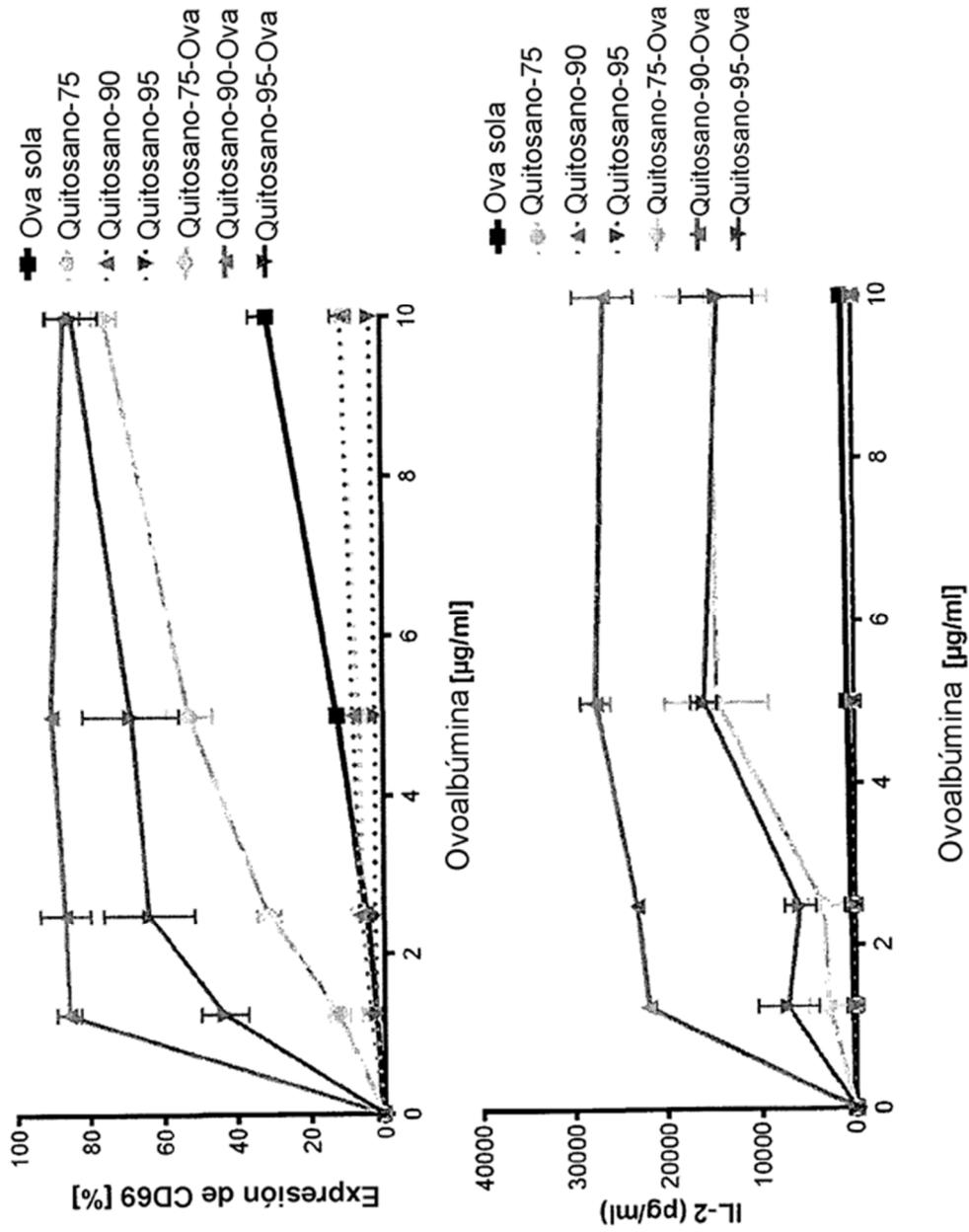


Figura 3

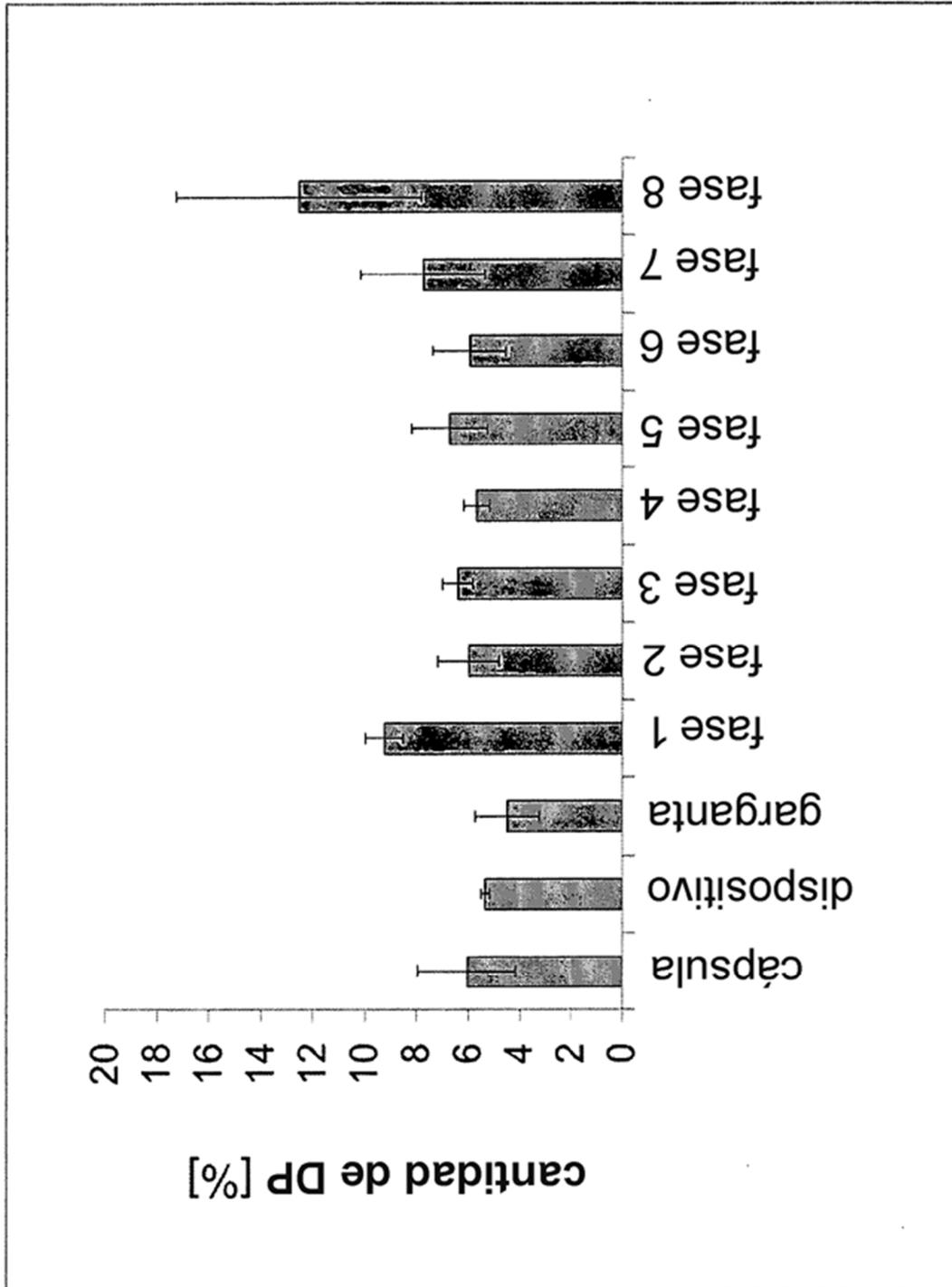


Figura 4

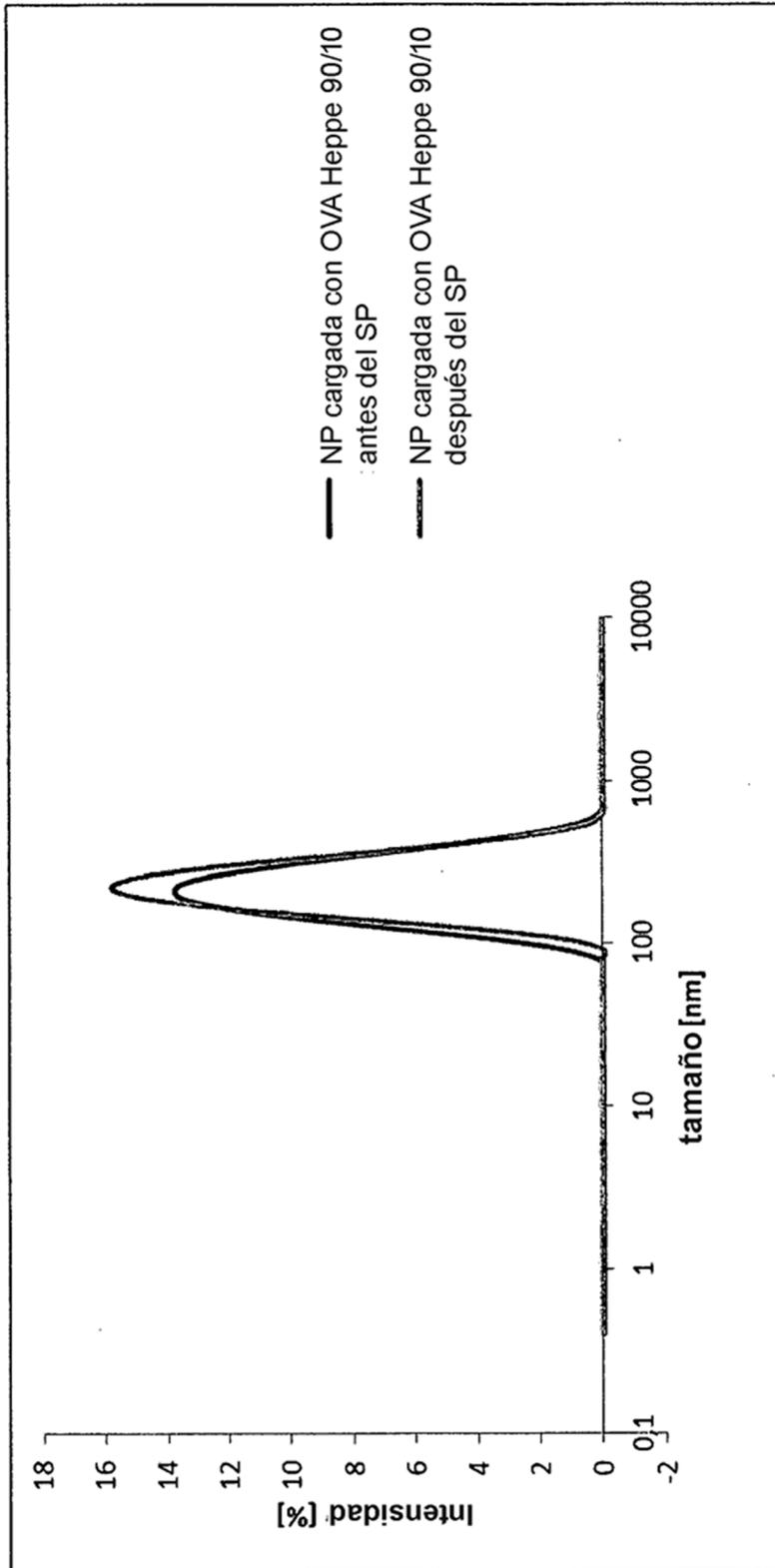


Figura 5