



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 351 756**

② Número de solicitud: 200901664

⑤ Int. Cl.:
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **28.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
10.02.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Vizcaya, ES**

⑱ Inventor/es: **Rodríguez Gascón, Alicia;
Solín Aspiazu, María Ángeles;
Pedraz Muñoz, José Luis;
Delgado San Vicente, Diego y
Pozo Rodríguez, Ana del**

⑳ Agente: **González Díaz, Vicente**

㉔ Título: **Nanopartículas lipídicas para terapia génica.**

㉖ Resumen:

Nanopartículas lipídicas para terapia génica.

La presente invención se relaciona con un sistema de nanopartículas lipídicas que comprenden un componente lipídico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo no iónico, un polisacárido y, opcionalmente, un péptido de carga positiva, útil para la liberación de moléculas farmacológicamente activas, y especialmente para transfectar material genético en células y/o tejidos. Asimismo, se dirige a procedimientos para la obtención de nanopartículas, a composiciones farmacéuticas que lo comprenden, así como a su uso en terapia génica.

ES 2 351 756 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas lipídicas para terapia génica.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema de nanopartículas lipídicas útil para la liberación de moléculas farmacológicamente activas, y especialmente para transfectar material genético en células y/o tejidos, así como a procedimientos para su obtención y composiciones farmacéuticas que lo comprenden.

10

Antecedentes

En las últimas décadas se han desarrollado una gran variedad de reactivos y técnicas para transferir material genético al interior de las células con el objeto de modular la expresión génica tanto *in vitro* como *in vivo*. Los mayores esfuerzos en este campo están enfocados en la búsqueda de sistemas con mayor eficiencia y en nuevas aplicaciones. Estos esfuerzos están permitiendo obtener sofisticados reactivos y tecnologías útiles para la producción de proteínas con aplicaciones clínicas y de investigación, para la adición de marcadores genéticos a una línea celular y para la modificación de la expresión de proteínas de una célula para evaluar el efecto de un gen (sobrexpresión o disminución de la expresión).

20

La terapia génica constituye una herramienta terapéutica muy prometedora para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades hereditarias o adquiridas. Los recientes avances en biología molecular y el conocimiento del genoma humano han permitido disponer de una valiosa información sobre los procesos celulares y la patogenia de muchas enfermedades. En los últimos años se han identificado numerosos genes implicados en procesos patológicos; además, se está investigando mucho con sistemas de expresión de esos genes para ser utilizados con fines terapéuticos. Sin embargo, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas usando este material biológico depende de la capacidad de manipular la expresión de estos genes en las células adecuadas.

25

El número de enfermedades que pueden ser potencialmente tratadas mediante terapia génica es muy amplio, y se incluyen, entre otras, enfermedades autosómicas recesivas debidas al defecto de un único gen (fibrosis quística, hemofilia, enfermedad de Fabry, etc.), enfermedades autosómicas dominantes, algunos cánceres, VIH y otras enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, etc.

30

La terapia génica consiste en la introducción de material genético (ADN, ARN o secuencias antisentido) en células diana con el fin de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que provoca la alteración de las mismas. Se pueden administrar genes desnudos de forma local en determinados órganos como el músculo o el hígado mediante medios físicos, como la electroporación o la inyección hidrodinámica. Sin embargo, estos métodos no son útiles para la administración sistémica o son inviables desde el punto de vista de su comercialización como medicamentos. Para desarrollar un producto para terapia génica hay que tener en cuenta, no sólo la enfermedad que se quiere tratar y el gen terapéutico a administrar, si no que es muy importante el sistema de administración de ese gen. Es necesario que el sistema de administración sea capaz de proteger el material genético frente a la degradación enzimática y que facilite la captación celular y posterior liberación en el citoplasma celular. Además, debe permitir controlar la localización del gen en el organismo así como la duración de la expresión génica. Los sistemas de administración de genes pueden clasificarse en vectores virales o no virales. Los vectores virales son los más efectivos, pero presentan grandes problemas de inmunogenicidad y oncogenicidad. Otro inconveniente es que sólo pueden incluir genes de pequeño tamaño.

35

40

45

Debido a los inconvenientes que presentan estos sistemas de transfección viral, existe una importante necesidad de desarrollar sistemas de transfección no viral con una adecuada eficacia de transfección que supongan una mejor alternativa a la utilización de los vectores virales. Los vectores no virales son, de hecho, mucho más seguros, su producción es más sencilla y más barata y no presentan una limitación en cuanto al tamaño del material genético a incluir. En este sentido, los sistemas basados en nanopartículas han mostrado ser útiles como sistemas de transfección. Así, la solicitud US2008/0160096 describe la obtención de nanopartículas basadas en un polímero complejo con uno o más ácidos nucleicos, estando dicho complejo recubierto con un polianión. Por su parte, la solicitud WO2007/135164 hace referencia a la preparación de nanopartículas basadas en quitosano y hialuronano para la asociación de material genético, habiéndose demostrado su particular utilidad para transfectar tejido ocular.

50

55

Existen además en la literatura varios documentos que describen la obtención y empleo de nanopartículas lipídicas como vectores para el transporte de material genético a las células (WO2005/120469, WO2006/087752, WO2004/096140 y US2008/0213350). En particular, el documento de *Del Pozo-Rodríguez et al. (J. Control. Rel., 2009, 133, 52-59)* hace referencia a un sistema de nanopartículas lipídicas que incorpora además tensioactivos iónicos, donde dichas nanopartículas se ponen en contacto con un complejo constituido por un plásmido y un péptido para recubrir a éstas. Nanopartículas lipídicas en las que también se incorpora un péptido, se encuentran descritas en WO00/06120. Por su parte, la solicitud US2006/0189554 describe una vacuna que incorpora un sistema de nanopartículas lipídicas sobre las que se deposita en su superficie un adyuvante, adsorbiéndose posteriormente un plásmido de ADN. No obstante, la mayoría de estos sistemas presentan como principal desventaja una baja eficacia de transfección.

60

65

A la vista de estos datos, existe, por tanto, una necesidad de desarrollar medicamentos para terapia génica basados en vectores no virales seguros y con una adecuada eficacia de transfección.

Breve descripción de la invención

5 Los autores de la presente invención han encontrado que un sistema de nanopartículas lipídicas que incorpora un polisacárido en su composición, permite conseguir un eficaz nivel de transfección de material genético en las células, así como una elevada viabilidad celular, como así demuestran los ejemplos realizados *in vitro* en células eucariotas de mamíferos ARPE-19.

10 Asimismo, estudios *in vivo* han demostrado la capacidad de este sistema de nanopartículas para alcanzar las células de bazo e hígado, permitiendo la expresión de plásmidos de ADN como pCMS-EGPF de forma efectiva, lo que hace a este sistema ser potencialmente útil en terapia génica.

15 Este sistema ha sido capaz además de proteger el material genético de la acción de enzimas, en particular, de nucleasas, que están presentes en los fluidos biológicos, lo que evita su degradación o ruptura en este medio biológico, evitando así que el material genético se libere de las nanopartículas antes de alcanzar su objetivo final.

20 Así, en un primer aspecto la invención se dirige a un sistema para la liberación de moléculas biológicamente activas, que comprende nanopartículas con un tamaño promedio de partícula igual o inferior a 1 micra, donde las nanopartículas comprenden:

- al menos un lípido sólido a temperatura ambiente;
- 25 - al menos un tensioactivo catiónico;
- al menos un tensioactivo no iónico; y
- 30 - al menos un polisacárido, donde dicho polisacárido comprende la unión de al menos tres monosacáridos, con la condición de que dicho polisacárido no sea un lipopolisacárido, y donde dicho polisacárido se encuentra incorporado dentro de la estructura de las nanopartículas o bien adsorbido sobre la superficie de las mismas.

35 Por otra parte, se ha observado que la incorporación del polisacárido junto con un péptido de carga positiva, permite aumentar de forma sinérgica los niveles de transfección cuando se compara con un sistema de nanopartículas que incluye únicamente el mencionado péptido o el polisacárido, así como mejorar la viabilidad celular tal como se recoge en los ejemplos aportados en esta solicitud. En consecuencia, un aspecto adicional de la presente invención lo constituye un sistema como el mencionado anteriormente que comprende además un péptido de carga positiva, donde dicho péptido se encuentra incorporado dentro de la estructura de las nanopartículas o bien adsorbido sobre la superficie de las mismas.

40 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido anteriormente, que comprende:

- 45 (i) preparar una disolución que comprende el lípido sólido a temperatura ambiente, en un disolvente orgánico,
- (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico,
- (iii) añadir la fase acuosa (ii) sobre la fase oleosa (i), sometiendo la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión,
- 50 (iv) evaporar el disolvente orgánico,

55 donde el polisacárido, y opcionalmente el péptido, se adicionan a la disolución (ii) o bien forman parte de una disolución acuosa que se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente formadas tras la consecución de las etapas (i) a (iv).

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de un sistema como se ha definido anteriormente, que comprende:

- (i) fundir el lípido sólido a temperatura ambiente,
- (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico,
- 65 (iii) añadir la fase acuosa (ii) sobre el lípido fundido (i), sometiendo la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión,

ES 2 351 756 A1

- (iv) someter la emulsión (iii) a un proceso de homogeneización con una presión de al menos 30 psi y con al menos 1 ciclo,

5 donde el polisacárido, y opcionalmente el péptido, se adiciona a la disolución (ii) o bien forman parte de una disolución acuosa que se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente formadas tras la consecución de las etapas (i) a (iv).

10 Asimismo, la invención se dirige a una composición farmacéutica o cosmética que comprende el sistema de nanopartículas como se ha definido previamente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema de nanopartículas como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento.

15 Un aspecto adicional lo constituye un sistema de nanopartículas como se ha definido anteriormente, para su uso en la preparación de un medicamento para terapia génica.

20 Un último aspecto de la invención se relaciona con un kit para la inmovilización, transporte y/o liberación controlada de sustancias activas que comprende un sistema de nanopartículas como se ha definido anteriormente.

Descripción de las figuras

25 Figura 1. Fotografía de fuerza atómica. Nanopartículas lipídicas sin ningún componente biológicamente activo (1A) y formulación 1 (1B).

Figura 2. Fotografía de las formulaciones 1, 2 y 3 obtenidas mediante microscopía a 100x.

30 Figura 3. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 2 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

35 Figura 4. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 3 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

Figura 5. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 4 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

40 Figura 6. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 5 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

45 Figura 7. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 6 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

50 Figura 8. Nivel de transfección y viabilidad celular *in vitro* de las formulaciones 1, 2, 3 y DOTAP liposomal en células ARPE-19.

Figura 9. Fotografía de microscopía de fluorescencia que muestra el nivel de transfección y viabilidad celular *in vitro* de las formulaciones 1, 2, 3.

55 Figura 10. Fotografía de microscopía de fluorescencia de muestras de bazo, hígado y pulmón de ratón en el que se muestra la expresión de pCMS-EGFP tras la administración de la formulación 3 a ratones por vía endovenosa.

Descripción detallada de la invención

60 El sistema de la presente invención comprende nanopartículas, las cuales presentan una estructura que comprende una fase lipofílica y una fase hidrofílica, en la que puede incorporarse una molécula biológicamente activa. Dichas nanopartículas se encuentran en un medio acuoso aunque, opcionalmente, pueden presentarse como productos liofilizados o desecados.

65 En el contexto de la presente invención, el término “nanopartícula” se refiere a una estructura que comprende un núcleo de naturaleza lipofílica rodeado por una fase hidrofílica que encapsula el núcleo. La interacción iónica resultante entre los distintos componentes lipofílicos e hidrofílicos de la nanopartícula genera entidades físicas características, independientes y observables, cuyo tamaño medio es igual o inferior a 1 μm , es decir, un tamaño medio comprendido entre 1 y 1000 nm.

ES 2 351 756 A1

Por “tamaño promedio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas, que comprenden la fase lipofílica y la fase hidrofílica. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental más adelante.

5 Las nanopartículas del sistema de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula igual o inferior a $1\ \mu\text{m}$, preferentemente tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 1000 nm, más preferentemente entre 100 y 350 nm. Este tamaño permite a las nanopartículas penetrar en las células y administrar la molécula biológicamente activa. El tamaño medio de las cápsulas se ve influenciado principalmente por la cantidad del componente lipídico (a cantidades mayores, el tamaño resultante es igual o mayor), por la cantidad de tensioactivos (a mayor cantidad o peso molecular el tamaño es igual o inferior), y por parámetros del procedimiento de preparación, tal como la
10 velocidad y tipo de agitación, la temperatura de ambas fases o la duración de la fase de mezclado.

Por otra parte, las nanopartículas pueden presentar una carga superficial (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede variar desde -50 mV hasta +80 mV.

15 *Componente lipídico*

La formulación de nanopartículas de la presente invención comprende al menos un lípido sólido a temperatura ambiente que forma parte del núcleo de la nanopartícula.

20 En el contexto de la presente invención, se entiende por “lípido sólido a temperatura ambiente” aquel lípido que se mantienen en forma sólida por debajo de 45°C , pudiendo ser saturado o insaturado. En dicha definición, se incluyen triglicéridos (por ejemplo triestearina), mono o diglicéricos (por ejemplo Imwitor[®]), ácidos grasos (por ejemplo ácido esteárico), esteroides (por ejemplo colesterol) y ceras (por ejemplo cetil palmitoato).

25 En una realización particular, el lípido sólido a temperatura ambiente se selecciona entre acilglicéridos, ácidos grasos saturados con una cadena de al menos 10 átomos de carbono o derivados de los mismos y mezclas de los mismos.

30 Los acilglicéridos incluyen tanto monoglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos como mezclas de los mismos. En una realización preferente los acilglicéridos se seleccionan entre palmitoestearato de glicerilo (Precirol[®] ATO5), monoestearato de glicerilo (Imwitor[®]900), behenato de glicerilo (Compritol[®] 888ATO).

35 En una realización particular, los ácidos grasos son saturados y presentan una cadena de al menos 10 átomos de carbono. Asimismo, pueden emplearse derivados de estos ácidos grasos, entendiéndose como tales aquellos compuestos producidos como consecuencia de la reacción del grupo ácido con alcoholes o aminas, tales como por ejemplo los ésteres o amidas de dichos ácidos grasos. De la misma forma, se incluyen en la definición de derivados de ácidos grasos aquellos ácidos grasos, sus ésteres o sus amidas que presentan grupos hidroxilo como sustituyentes de la cadena hidrocarbonada.

40 En una realización preferente, se emplea como derivado de ácido graso el palmitoestearato de glicerilo (Precirol[®] ATO5).

45 En otra realización particular, las nanopartículas comprenden además otro componente lipídico, en concreto un lípido líquido a temperatura inferior a 45°C , pudiendo ser saturado o insaturado. El lípido líquido a temperatura ambiente se selecciona entre aceites, ácidos grasos, triglicéridos y ésteres de ácidos grasos insaturados, o saturados que presentan una cadena de menos de 10 átomos de carbono, y sus mezclas (por ejemplo Miglyol[®], aceite de soja, miristato de isopropilo, aceite de ricino). En una realización preferente, se emplea como lípido líquido Mygliol 212.

50 *Tensioactivo catiónico*

La fase hidrofílica de las nanopartículas que rodea al núcleo lipofílico comprende un tensioactivo catiónico. La función de este componente es principalmente la de dotar a la nanopartícula de una carga positiva que permita su absorción a través de entornos biológicos de carácter catiónico o su adsorción sobre ellos.

55 Por el término “tensioactivo catiónico” se entiende aquél compuesto que presenta una parte hidrófoba y una parte hidrofílica, que en solución forma iones cargados positivamente y que permite conseguir una emulsión.

60 En una realización particular de la invención, el tensioactivo catiónico se selecciona entre sales de amonio primario, secundario, terciario y cuaternario, ya sean de estructura lineal o cíclica, y mezclas de las mismas, como por ejemplo sales de piridina, piperizina.

65 Asimismo, se pueden emplear derivados de estas sales de amonio. Como derivados de sales de amonio se entiende aquellas sales que incorporan en la misma estructura al menos dos grupos amino ya sean primario, secundario, terciario y/o cuaternario, tales como por ejemplo las sales de guanidina, piperazina e imidazol. En esta definición, estarían también comprendidas las sales de aminoácidos, tales como por ejemplo las sales de lisina, arginina, ornitina o triptófano. Asimismo, se encontrarían englobadas en esta definición aquellas sales de amonio en las cuales la carga positiva se encuentra sobre un átomo de fósforo, como por ejemplo Ditetradecyl (trimethylethylphosphonio) methylphosphona-

ES 2 351 756 A1

te iodide, Ditetradecyl (butyldimethylphosphonio) methylphosphonate iodide, Ditetradecyl (dimethylisopropylphosphonio) methylphosphonate iodide) o arsénico (Ditetradecyl (Trimethylarsonio) methylphosphonate Iodide, Dioleoyl (trimethylphosphonio) methylphosphonate iodide), en lugar de sobre el átomo de nitrógeno.

5 En una realización preferente de la presente invención, las sales de amonio son sales de tetraalquilamonio, sales de alquilbencil dimetil amonio o sales de amonio heterocíclicas, más preferentemente son bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), o DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleilyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonio chloride).

10 *Tensioactivo no iónico*

Las nanopartículas comprenden adicionalmente un tensioactivo no iónico cuyas funciones principales son controlar el tamaño de partícula y conferir estabilidad, evitando la ruptura de éstas y la formación de agregados.

15 Por el término “tensioactivo no iónico” se entiende aquél compuesto que presenta una parte hidrófoba y una parte hidrofílica que permite conseguir una emulsión.

En una realización particular de la presente invención el tensioactivo no iónico se selecciona entre polisorbatos, copolímeros de polietilenglicol y copolímeros de polipropilenglicol, como por ejemplo Tween, Span, Poloxamer.

20 *Polisacárido*

El sistema de nanopartículas de la presente invención comprende adicionalmente un polisacárido cuyas funciones principales son facilitar la interacción de las nanopartículas con la superficie celular y modificar la carga superficial de la nanopartícula.

Este componente puede formar parte de la estructura de las nanopartículas o bien puede quedar adsorbido sobre la superficie de las mismas. Cuando el polisacárido forma parte de la estructura de las nanopartículas, éste se encuentra en la fase hidrofílica que rodea el núcleo lipofílico junto con el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

30 Alternativamente, el polisacárido puede formar un complejo junto con el ingrediente activo a incorporar en la formulación de nanopartículas mediante interacción iónica. Dicho complejo se pone en contacto con las nanopartículas previamente formadas, de manera que el complejo formado por el polisacárido y el ingrediente activo queda adsorbido sobre la superficie de dichas nanopartículas.

35 En una realización particular, el polisacárido se selecciona entre quitosanos, dextranos, ácido hialurónico, carragenano, condroitina, keratano, ácido colomínico, xantano, ciclodextrinas, sales, derivados y mezclas de los mismos. En una realización preferente, el polisacárido se selecciona entre dextrano y ácido hialurónico.

40 *Péptido de carga positiva*

El sistema de nanopartículas de la invención puede comprender además un péptido de carga positiva, entendiéndose como tal aquel péptido que en disolución se ionizan dando lugar a carga neta positiva.

45 Los autores de la presente invención han observado que la combinación del polisacárido con el mencionado péptido de carga positiva permite aumentar de forma sinérgica los niveles de transfección así como mejorar la viabilidad celular, tal como se ha puesto de manifiesto en la transfección del plásmido pCMS-EGFP en la línea celular ARPE-19 de pigmento retinal humano.

50 Al igual que el polisacárido, el péptido de carga positiva puede formar parte de la estructura de las nanopartículas o bien puede quedar adsorbido sobre la superficie de las mismas. Cuando el péptido de carga positiva forma parte de la estructura de las nanopartículas, éste se encuentra en la fase hidrofílica que rodea el núcleo lipofílico junto con el tensioactivo catiónico, el tensioactivo no iónico y el polisacárido.

55 Alternativamente, el péptido de carga positiva puede formar un complejo junto con el polisacárido y el ingrediente activo a incorporar en la formulación de nanopartículas. Dicho complejo se pone en contacto con las nanopartículas previamente formadas, de manera que el complejo formado por el polisacárido, el péptido de carga positiva y el ingrediente activo queda adsorbido sobre la superficie de dichas nanopartículas.

60 En una realización particular de la presente invención, el péptido de carga positiva se selecciona entre péptidos de señalización nuclear (péptidos que dirigen hacia el núcleo) y péptidos de señalización mitocondrial (péptidos que dirigen hacia las mitocondrias), péptidos RGD (péptidos de reconocimiento de la superficie celular, que contienen la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico y variantes de la misma) y CPP (péptidos de penetración celular). Preferiblemente dicho péptido se selecciona entre protaminas e histonas.

65 En una variante de la invención, el sistema tiene una proporción de componente lipídico que está comprendida entre 0.1% y 20% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.5% y 5%. En otra variante de la invención, cuando se incorpora un lípido líquido a temperatura ambiente en la formulación de

ES 2 351 756 A1

las nanopartículas, éste se encuentra en una proporción comprendida entre 0.1 y 5% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.5 y 2%.

5 Por otro lado, en otra variante de la invención la proporción de tensioactivo catiónico oscila entre 0.05% y 5% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1% y 2%.

En otra variante de la invención, la proporción de tensioactivo no iónico está comprendida preferentemente entre 0.01 y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1 y 3%.

10 En otra variante de la invención, la proporción de polisacárido se encuentra comprendida entre 0.01 y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1 y 3%.

15 Por su parte, la proporción del péptido de carga positiva, cuando éste se encuentra presente en la formulación, está preferentemente comprendida entre 0.01% y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, más preferentemente entre 0.1% y 3% en peso.

20 En todos los casos la proporción restante corresponde mayoritariamente a agua purificada donde se encuentran dispersas las nanopartículas. Esto no significa que otros ingredientes no puedan estar presentes tales como moduladores de la viscosidad, conservantes, solubilizantes, antifloculantes, estabilizantes, especialmente estéricos o iónicos o tensoactivos, bien en las nanopartículas, bien en el medio acuoso donde están dispersas o bien adsorbidos sobre ellas.

25 Las nanopartículas de la presente invención proporcionan sistemas que tienen una elevada capacidad para asociar moléculas biológicamente activas, bien dentro de las nanopartículas o bien adsorbidas sobre ellas. En concreto, el sistema de nanopartículas de la invención permite asociar hasta el 100% de la molécula activa cuando ésta es un plásmido. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un sistema tal como el descrito anteriormente que comprende además una molécula biológicamente activa.

30 El término "molécula biológicamente activa" se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que se utiliza para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales. Según la presente invención, las nanopartículas lipídicas desarrolladas son adecuadas para incorporar moléculas biológicamente activas independientemente de las características de solubilidad de las mismas. La capacidad de asociación dependerá de la molécula incorporada, pero en términos generales será elevada tanto para moléculas hidrófilas, como para las de marcado carácter hidrófobo. Estas moléculas pueden incluir polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, hormonas, antígenos/alérgenos, según el objetivo sea generar una respuesta inmune o tolerancia, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, polinucleótidos y mezclas de los mismos.

35 En una realización preferida de la invención la molécula biológicamente activa es un plásmido de ADN, tal como pEGFP, o un ácido nucleico, más preferentemente es ADN, mRNA, iARN, microARN o secuencia antisentido.

40 Dependiendo de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de la molécula biológicamente activa, ésta se incorpora, respectivamente, a la fase lipofílica o a la fase hidrofílica de las nanopartículas. No obstante, en una realización particular, la molécula biológicamente activa puede quedar adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas una vez formadas éstas.

45 La proporción de principio activo incorporado en las nanopartículas puede llegar a ser de hasta el 20% en peso con respecto al peso total del sistema, incluyendo el agua. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso del principio activo que vaya a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración.

50 En el caso específico de incorporar como principio activo un oligonucleótido o un ácido nucleico, la proporción del mismo en dicho sistema estaría entre un 0,00001% y un 20% en peso con respecto al peso total del sistema incluido el agua.

55 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el sistema de nanopartículas definido previamente y una molécula biológicamente activa que puede prevenir, aliviar o curar enfermedades.

60 Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (es decir, suspensión o dispersión de la nanopartículas de la invención) para aplicación por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal o vaginal, o cualquier composición en la forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su administración por vía tópica, ocular, nasal o vaginal.

65 En un aspecto preferente, la formulación se administra por vía mucosa. Las nanopartículas proporcionan una buena absorción de los fármacos sobre la superficie mucosa a través de su interacción con la mucosa y las superficies de las células.

En otro aspecto preferente, la formulación se administra por vía intradérmica o transdérmica, entendiéndose como tal, la administración a través o sobre la piel.

En otro aspecto preferente, la formulación se administra por vía parenteral.

ES 2 351 756 A1

Debido a sus buenas propiedades para administración sobre o a través de la piel, los sistemas de la invención también son muy adecuados para aplicaciones cosméticas.

5 Por lo tanto un objeto adicional de la presente invención lo constituye una composición cosmética que comprende el sistema de nanopartículas previamente definido. Estas composiciones cosméticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de nanopartículas) o cualquier composición que comprenda el sistema de la invención y que esté en forma de gel, crema, pomada o ungüento para su administración por vía tópica. Dichas composiciones se caracterizan por presentar propiedades emolientes, protectoras y cicatrizantes incluso aunque no tengan asociada ninguna molécula cosmetológicamente activa.

10 En una variante de la invención, la composición cosmética también puede incorporar moléculas activas de naturaleza lipofílica o hidrofílica que, aunque no presenten efecto terapéutico, tienen propiedades como agente cosmético. Entre las moléculas activas que pueden incorporarse a las nanopartículas cabe citar agentes emolientes, conservantes, sustancias aromatizantes, agentes anti-acné, antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, anticaspa, despigmentantes, antiseborreicos, colorantes, bronceadores, absorbentes de luz UV, enzimas, sustancias aromatizantes, entre otros.

15 Las composiciones farmacéuticas y cosméticas pueden comprender además agentes controladores de pH como por ejemplo agentes tampón, los cuales evitan que el pH de la composición disminuya a valores por debajo de 5, agentes antioxidantes, que inhiben la oxidación del componente lipídico, así como conservantes que evitan cambios estructurales importantes en la formulación.

20 Dependiendo de su función, estos componentes adicionales pueden estar presentes en las fases que componen las nanopartículas o bien en el medio acuoso donde éstas se encuentran dispersas o bien adsorbidos total o parcialmente sobre ellas. El experto en la materia puede determinar qué componentes adicionales se pueden utilizar y si son necesarios, siendo muchos de ellos de uso común en composiciones farmacéuticas y cosméticas.

25 Un aspecto adicional de la presente invención lo constituye un procedimiento [de aquí en adelante procedimiento 1] para la elaboración del sistema de la invención, tal como se ha definido anteriormente, que comprende las nanopartículas. Dicho procedimiento 1 comprende una primera etapa de preparación de la fase lipídica mediante disolución del lípido sólido a temperatura ambiente en un disolvente orgánico, donde la proporción del componente lipídico es al menos de un 0,1% en peso con respecto al peso total de la solución orgánica, preferiblemente se encuentra comprendido entre 0,1 y 40% en peso.

30 En una realización particular, cuando la molécula biológicamente activa a incorporar en las nanopartículas tiene naturaleza lipofílica y además se quiere incorporar en el interior de la estructura de las nanopartículas, dicha molécula activa se disuelve junto con el lípido en el disolvente orgánico.

35 La elección del disolvente orgánico depende en gran medida tanto del componente lipídico como, en su caso, del ingrediente activo incorporado. No obstante lo anterior, se prefiere el empleo de disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables y el empleo de la menor cantidad posible, debido a que tendrá que ser posteriormente eliminado en la etapa final del procedimiento que conduce a la obtención de las nanopartículas.

40 En una realización particular de la invención, el disolvente orgánico se selecciona entre diclorometano, acetona, cloroformo, más preferentemente es diclorometano. La proporción del disolvente orgánico puede oscilar entre 1 y 60% en peso respecto al peso total del sistema, incluido el agua, más preferentemente oscila entre 10 y 30% en peso.

45 En otra realización particular, se puede añadir a la fase lipofílica un lípido líquido a temperatura ambiente tal como se ha mencionado previamente.

50 Una segunda etapa del procedimiento 1 consiste en disolver el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico en agua. Adicionalmente, el polisacárido puede disolverse en esta fase acuosa junto con los tensioactivos, así como el péptido de carga positiva cuando éste se encuentra presente en la formulación de las nanopartículas.

55 En una realización particular, cuando la molécula biológicamente activa a incorporar en las nanopartículas tiene naturaleza hidrofílica y además se quiere incorporar en el interior de la estructura de las nanopartículas, dicha molécula activa se disuelve junto con el resto de componentes de la fase acuosa en el agua.

60 Una vez preparadas ambas disoluciones, la fase acuosa se adiciona sobre la fase lipídica. El orden de adición debe ser el indicado con el fin de obtener la emulsión de fase externa acuosa. La mezcla resultante se somete a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión.

65 Posteriormente, se procede a la evaporación del disolvente orgánico mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. En una realización particular, la etapa de evaporación del disolvente orgánico se efectúa manteniendo la emulsión en agitación mecánica durante al menos cinco minutos, sometiéndola posteriormente a vacío durante al menos cinco minutos. Tras la eliminación del disolvente orgánico, la fase lipídica solidifica, obteniéndose de esta manera una suspensión de nanopartículas.

ES 2 351 756 A1

En una realización particular, el procedimiento 1 comprende además una etapa de enfriamiento de la suspensión de nanopartículas a una temperatura comprendida entre 4 y 8°C y posterior filtración por centrifugación para, finalmente, resuspender las nanopartículas en agua purificada.

5 En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento [de aquí en adelante procedimiento 2] para la elaboración del sistema de la invención, tal como se ha definido anteriormente, que comprende las nanopartículas. Dicho procedimiento 2 comprende una primera etapa de preparación de la fase lipídica en la que el lípido sólido a temperatura ambiente se funde a una temperatura superior a su punto de fusión.

10 En una realización particular, cuando la molécula biológicamente activa a incorporar en las nanopartículas tiene naturaleza lipofílica y además se quiere incorporar en el interior de la estructura de las nanopartículas, dicha molécula activa se disuelve en el lípido fundido.

En otra realización particular, se adiciona al lípido fundido un lípido líquido a temperatura ambiente.

15 Una segunda etapa del procedimiento 2 consiste en disolver el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico en agua. Adicionalmente, el polisacárido puede disolverse en esta fase acuosa junto con los tensioactivos, así como el péptido de carga positiva cuando éste se encuentra presente en la formulación de las nanopartículas.

20 En una realización particular, cuando la molécula biológicamente activa a incorporar en las nanopartículas tiene naturaleza hidrofílica y además se quiere incorporar en el interior de la estructura de las nanopartículas, dicha molécula activa se disuelve junto con el resto de componentes de la fase acuosa en el agua.

25 Una vez preparadas ambas fases, la fase acuosa se adiciona sobre la fase lipídica. El orden de adición debe ser el indicado con el fin de obtener la emulsión de fase externa acuosa. La mezcla resultante se somete a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión.

30 Posteriormente, se somete la emulsión resultante a una etapa de homogenización mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, con el fin de obtener partículas con un tamaño comprendido en el intervalo nanométrico, es decir, hasta un tamaño igual o inferior a 1 µm.

35 Por “homogeneización” se entiende cualquier proceso que permite, por medios mecánicos, reducir el tamaño de los glóbulos formados en la emulsión que resulta de llevar a cabo las etapas i) a iii) del procedimiento 2 de la invención. Ejemplos de procedimientos de homogenización incluyen homogenización a alta presión, sonicación, mezclado a alta cizalladura o la aplicación de fuerzas de impacto o tensión mecánica.

En una realización particular, el proceso de homogeneización se lleva a cabo mediante homogeneización a alta presión, en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al menos un ciclo.

40 En una realización particular, el procedimiento 2 comprende además una etapa de enfriamiento de la suspensión de nanopartículas a una temperatura comprendida entre 4 y 8°C y posterior filtración por centrifugación para, finalmente, resuspender las nanopartículas en agua purificada.

45 En una realización particular, la molécula biológicamente activa no se incorpora dentro de la estructura de la nanopartícula sino que se encuentra adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas. Para ello, dicha molécula activa se disuelve en una solución acuosa que, posteriormente, se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente obtenidas según cualquiera de los dos procedimientos descritos anteriormente. Preferentemente, la puesta en contacto se efectúa a temperatura ambiente durante al menos cinco minutos con el fin de obtener un vector no viral que comprende las nanopartículas lipídicas sobre cuya superficie queda adsorbida la molécula biológicamente activa.

50 En otra realización particular, el polisacárido y, opcionalmente, el péptido de carga positiva cuando éste se encuentra presente en la formulación, quedan adsorbidos sobre la superficie de las nanopartículas junto con la molécula biológicamente activa. Para ello, una vez obtenidas las nanopartículas lipídicas por cualquiera de los dos procedimientos descritos anteriormente, se prepara un complejo que comprende el polisacárido, el ingrediente activo y, opcionalmente el péptido de carga positiva, mediante la puesta en contacto de soluciones acuosas que comprenden, cada una de ellas, los tres componentes mencionados. Una vez obtenido dicho complejo, éste se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente obtenidas para obtener finalmente el vector no viral que comprende las nanopartículas lipídicas sobre cuya superficie quedan adsorbidos el polisacárido, la molécula biológicamente activa y, en su caso, el péptido de carga positiva.

60 Adicionalmente, se pueden añadir al sistema de nanopartículas otros ingredientes como se han descrito más arriba tales como moduladores de la viscosidad, conservantes, solubilizantes, antifloculantes, estabilizantes, especialmente estéticos o iónicos o tensoactivos. Estos componentes serán adicionados a la fase lipofílica o hidrofílica dependiendo de la naturaleza de los mismos.

65 A continuación, se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención, no obstante, no se deben interpretar como limitativos del objeto de la invención tal como está definido en las reivindicaciones.

ES 2 351 756 A1

Ejemplos

Las nanopartículas obtenidas se han caracterizado mediante su tamaño promedio, su carga superficial y su capacidad para incorporar material genético. Se detallan a continuación los procedimientos comunes utilizados para dicha caracterización:

1. Morfología

Las diferentes formulaciones se observaron por microscopía de fluorescencia utilizando un equipo Nikon Eclipse TE 2000-S. Las nanopartículas sin sustancia biológicamente activa y la formulación 1 se observaron por microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando el modo Multimode™ (Digital Instruments). Las imágenes se capturaron en Tapping Mode™ utilizando un cantilever de silicón (RTESP, rotated tapping etched silicon probe type) con una frecuencia de resonancia de aproximadamente 300 kHz.

2. Tamaño de partícula y carga superficial

Se midió el tamaño de partícula de todas las formulaciones mediante espectroscopia de correlación fotónica. La carga superficial se midió mediante velocimetría láser doppler. Ambos parámetros se midieron con un Zetasizer 3000.

3. Capacidad de unión del material genético a las nanopartículas

La capacidad de condensación del ADN a las nanopartículas se determinó mediante electroforesis en gel de azarosa con un 1% de bromuro de etido durante 30 minutos a 120 V. Las bandas se observaron en un transiluminador TFX-20 M (Vilber-Lourmat). Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital (Bio-Rad, DigiDoc, model).

Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas sin polisacárido ni péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 1)

Se prepara una disolución de precirol al 5% en diclorometano (2 mL). Por otro lado, se prepara una disolución acuosa (10 mL) de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se añade la fase acuosa sobre la fase oleosa, sometiendo la mezcla a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se procede a la evaporación del solvente orgánico, manteniendo la emulsión durante al menos 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante al menos 5 minutos. De este modo, el lípido precipita, obteniéndose una suspensión de nanopartículas. Tras enfriar a temperatura entre 4 y 8°C, se filtran por centrifugación y se resuspenden en agua purificada.

Para elaborar los complejos con el material genético se prepara una disolución del plásmido (pCMS-EGFP) de 1 µg/µL en agua destilada. Posteriormente, se pone en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantiene en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La figura 1 muestra una fotografía de fuerza atómica de las nanopartículas lipídicas sin componente biológicamente activo y de la formulación 1.

Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas con polisacárido y sin péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 2)

Nanopartículas lipídicas

Se prepara una disolución de precirol al 5% en diclorometano. Por otro lado, se prepara una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se añade la fase acuosa sobre la fase oleosa en una relación 1:5 y se somete la mezcla a sonicación (Branson Sonifier 250, Danbury) durante 30 s a 50 W. A continuación se procede a la evaporación del solvente orgánico, manteniendo la emulsión durante 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante 15 minutos. Tras enfriar en nevera (4-8°C) durante 15 minutos, las nanopartículas obtenidas se lavan centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Complejos dextrano:pCMS-EGFP

Se prepara una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se prepara otra solución acuosa mediante disolución de dextrano (1 µg/µL) en agua destilada.

Se ponen en contacto las dos disoluciones con una proporción dextrano:pCMS-EGFP de 5:1 y se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

ES 2 351 756 A1

A continuación, se pone en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantiene en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5

Ejemplo 3

Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 3)

10

Nanopartículas lipídicas

Se prepara una disolución de precirol al 5% en diclorometano. Por otro lado, se prepara una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se añade la fase acuosa sobre la fase oleosa en una relación 1:5 y se somete la mezcla a sonicación (Branson Sonifier 250, Danbury) during 30 s a 50 W. A continuación se procede a la evaporación del solvente orgánico, manteniendo la emulsión durante 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante 15 minutos. Tras enfriar en nevera (4-8°C) durante 15 minutos, la nanopartículas obtenidas se lavan centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

20

Complejos dextrano:protamina:pCMS-EGFP

Se prepara una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se prepara otra solución acuosa mediante disolución de dextrano (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se prepara otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada.

25

Se ponen en contacto las tres disoluciones con una proporción dextrano:protamina:pCMS-EGFP de 1:2:1 y se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se pone en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantiene en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

30

La figura 2 recoge las fotografías correspondientes a las formulaciones 1, 2 y 3 obtenidas mediante microscopía a 100x. En todos los casos, puede observarse la forma esférica de las partículas y su tamaño homogéneo, no apreciándose diferencias aparentes entre las tres formulaciones.

35

Ejemplo 4

Preparación de nanopartículas sin polisacárido ni péptido mediante la técnica de homogenización a alta presión (Formulación 4)

Se funden 100 mg de precirol calentando a 70°C. Por otro lado, se prepara una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se prepara una pre-emulsión añadiendo la fase acuosa (10 mL) sobre el lípido fundido, sometiéndola a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se somete la mezcla a homogenización a alta presión en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al menos 1 ciclo. Tras enfriar en nevera (4-8°C) durante 15 minutos, la nanopartículas obtenidas se lavan centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

50

Ejemplo 5

Preparación de nanopartículas con polisacárido y sin péptido mediante la técnica de homogenización a alta presión (Formulación 5)

55

Nanopartículas lipídicas

Se funden 100 mg de precirol calentando a 70°C. Por otro lado, se prepara una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se prepara una pre-emulsión añadiendo la fase acuosa (10 mL) sobre el lípido fundido, sometiéndola a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se somete la mezcla a homogenización a alta presión en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al menos 1 ciclo. Tras enfriar en nevera (4-8°C) durante 15 minutos, la nanopartículas obtenidas se lavan centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

65

Complejos dextrano:pCMS-EGFP

Se prepara una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se prepara otra solución acuosa mediante disolución de dextrano (1 µg/µL) en agua destilada.

ES 2 351 756 A1

Se ponen en contacto las dos disoluciones con una proporción dextrano:pCMS-EGFP: de 5:1 y se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5 A continuación, se pone en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantiene en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Ejemplo 6

10 *Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de homogenización a alta presión (Formulación 6)*

Nanopartículas lipídicas

15 Se funden 100 mg de precirol calentando a 70°C. Por otro lado, se prepara una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se prepara una preemulsión añadiendo la fase acuosa (10 mL) sobre el lípido fundido, sometiendo la mezcla a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se somete la mezcla a homogenización a alta presión en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al 3 menos 1 ciclo. Tras enfriar en nevera (4-8°C) durante 15 minutos, la nanopartículas obtenidas se lavan centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Complejos dextrano:protamina:pCMS-EGFP

25 Se prepara una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 5 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se prepara otra solución acuosa mediante disolución de dextrano (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se prepara otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada.

30 Se ponen en contacto las tres disoluciones con una proporción dextrano:protamina:pCMS-EGFP de 1:2:1 y se mantiene en agitación durante 30 3 minutos a temperatura ambiente.

35 A continuación, se pone en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantiene en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La tabla I recoge el tamaño de partícula y la carga superficial de todas las formulaciones:

Formulación	Tamaño de partícula (nm)	Carga superficial (mV)
Formulación 1	308 ± 6,8	+32,4 ± 0,5
Formulación 2	311 ± 20,1	+32 ± 1,8
Formulación 3	248,5 ± 7,87	+38 ± 1,0
Formulación 4	224,7 ± 2,61	+31,2 ± 4,2
Formulación 5	226.3±3,04	+29,8±2,3
Formulación 6	210±3,62	+34,2±2,8

50 Ejemplo 7

Capacidad de protección del ADN frente a DNAsa I y liberación inducida con SDS

55 Para conocer la capacidad de protección de las formulaciones sobre el ADN, se utilizó la enzima desoxirribonucleasa I (DNAsa I) que es capaz de hidrolizar las moléculas de ADN. Las formulaciones se pusieron en contacto con DNAsa durante 30 minutos a 37°C. Se utilizó 1 U de DNAsa por cada 2,5 µg de ADN. Pasados los 30 minutos, se añadió lauril sulfato sódico (SDS) hasta una concentración final del 1%, para detener la acción de la enzima y liberar el ADN de las muestras. Las muestras se analizan posteriormente en un gel de azarosa como se ha definido previamente en los procedimientos comunes.

60 En las figuras 3 a 7 se recogen los geles de electroforesis que muestran la capacidad de condensación del ADN, la capacidad de protección frente a DNAsas y la liberación inducida por SDS.

65 Se puede comprobar que tanto las nanopartículas que contienen el polisacárido, como las que contienen la combinación polisacárido-péptido, son capaces de condensar el ADN, de protegerlo frente a la DNAsa y además, el ADN es capaz de liberarse del complejo.

ES 2 351 756 A1

Ejemplo 8

Ensayos in vitro de capacidad de transfección celular de las nanopartículas

5 La evaluación *in vitro* de las formulaciones se llevó a cabo en la línea celular ARPE-19 (Human Embryonic Kidney). Estas células se mantuvieron en cultivo en medio Dulbecco's MEM: Ham's Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mix (DMEM: F-12) con suero de bovino fetal al 10%, antibiótico Normocin al 0.2% y penicilina. Los cultivos celulares se mantienen a 37°C en atmósfera de aire con un 5% de CO₂, realizando cambios del medio cada 2 ó 3 días. Los estudios de transfección se realizaron en placas de 24 pocillos con densidades de 30.000 células por pocillo y se dejaron incubar hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia. Entonces se retiró parte del medio, dejando el volumen necesario para cubrir todo el pocillo, añadiendo a continuación la formulación a estudiar. Se dejaron incubar durante 4 horas y entonces se añadió más volumen de medio. La cantidad de vectores que se añadió a cada pocillo fue la equivalente a 2,5 µg de ADN.

15 Se evaluó la transfección y la viabilidad celular mediante citometría de flujo (FACSCalibur™, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA). La fluorescencia debido a la EGFP se midió a 525 nm (FL1). Para cada muestra, se utilizaron 10.000 eventos. La viabilidad celular se analizó utilizando el kit BD Via-Probe™. Este kit contiene el reactivo 7-amino-actinomicina (7-AAD) utilizado para la exclusión de células no viables, que produce fluorescencia en contacto con las células muertas. La fluorescencia debido al 7-AAD, correspondiente a las células no viables, se midió a 650 nm (FL3), tomándose 10.000 eventos por muestra. Se utilizaron como control células sometidas a las condiciones de cultivo habituales. Con todas las formulaciones se obtuvieron viabilidades superiores al 80%, un valor similar al obtenido con los controles (células sin transfectar); esto indica una ausencia aparente de toxicidad. Por otro lado, la inclusión del polisacárido (formulación 2) y la combinación de péptido + polisacárido (formulación 3), incrementa la viabilidad con respecto a la formulación que no incluye esos componentes (formulación 1). Las diferencias son más notables para la formulación 3.

Los estudios de transfección se llevaron a cabo en células ARPE-19. Se midió, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células transfectadas (% células EGFP positivas) y la viabilidad celular. La figuras 8 y 9 muestran los resultados correspondientes a los estudios de transfección y viabilidad celular en las células ARPE-19. Se hizo un estudio con DOTAP liposomal como control.

Como puede comprobarse, la incorporación en la formulación de un polisacárido incrementa la transfección con respecto al grupo control (nanopartículas sin polisacárido ni péptido). No obstante, la incorporación en la formulación de un polisacárido y un péptido permite aumentar de forma sinérgica los niveles de transfección cuando se compara con un sistema de nanopartículas que incluye únicamente el mencionado polisacárido, así como mejorar la viabilidad celular.

Ejemplo 9

Ensayos in vivo de capacidad de transfección de las nanopartículas

Para conocer la capacidad de transfección de las nanopartículas, se llevó a cabo un estudio *in vivo* que consistió en la administración intravenosa de las formulaciones a ratones Balb/c.

Se administró la formulación 1 y la formulación 3. La administración se hizo a través de la vena de cola, inyectándose la formulación en un volumen de 100 µL, correspondiente a una dosis del plásmido pCMS-EGFP de 60 µg. Como grupos control, se utilizaron ratones a los que se les administró el plásmido libre y nanopartículas libres de plásmido. A los 3 y 7 días después de la administración, los animales se sacrificaron y se extrajeron el pulmón, hígado y bazo. Los órganos se colocaron en medio de congelación (Jung, Leica), se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se seccionaron mediante un criostato (Cryocut 3.000, Leica). Cada grupo lo formaban 3 animales. De cada órgano, se obtuvieron 12 secciones.

Las secciones (7-10 µm) se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavarlos en PBS, las secciones se trataron con Tritón® X-10 y suero de cabra (NGS) al 2% en PBS, 1M durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se incubaron con un anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti-GFP) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras una fase de lavado con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se lavaron de nuevo con PBS y se cubrieron con Fluoromount G.

La figura 10 se recogen fotografías de microscopía de fluorescencia de muestras de bazo, hígado y pulmón de ratón obtenidas mediante un microscopio de fluorescencia invertido (eclipse TE2000-S, Nikon) en el que se muestra la expresión de pCMS-EGFP tras la administración de la formulación 3 a ratones por vía endovenosa.

ES 2 351 756 A1

La siguiente tabla recoge la transfección obtenida con las diferentes formulaciones:

Tiempo	Hígado	Bazo	Pulmón
	Formulación 1		
3 días	100% secciones	100% secciones	--
7 días	17% secciones	17% secciones	--
	Formulación 3		
3 días	84,6% secciones	100% secciones	66,7% secciones
7 días	37,5% secciones	100% secciones	60% secciones

Estos resultados indican que las formulaciones son capaces de transfectar *in vivo*, células de hígado, bazo y pulmón. Dependiendo de la composición, se obtienen diferentes niveles de transfección en los diferentes tejidos estudiados. La inclusión de la combinación péptido + polisacárido hace incrementar significativamente los niveles de transfección y la duración de la misma, respecto a la formulación libre de estos componentes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema para la liberación de moléculas biológicamente activas que comprende nanopartículas con un tamaño promedio de partícula igual o inferior a 1 micra, donde 1 as nanopartículas comprenden:
- al menos un lípido sólido a temperatura ambiente;
 - al menos un tensioactivo catiónico;
 - 10 - al menos un tensioactivo no iónico; y
 - al menos un polisacárido, donde dicho polisacárido comprende la unión de al menos tres monosacáridos, con la condición de que dicho polisacárido no sea un lipopolisacárido, y donde dicho polisacárido se encuentra incorporado dentro de la estructura de las nanopartículas o bien adsorbido sobre la superficie de las mismas.
 - 15
2. Sistema según la reivindicación 1, que además comprende al menos un péptido de carga neta positiva.
- 20 3. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además comprende una molécula biológicamente activa.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el lípido sólido a temperatura ambiente se selecciona entre monoglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos y mezclas de los mismos.
- 25 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el tensioactivo catiónico se selecciona entre sales de amonio primario, secundario, terciario y cuaternario, de estructura lineal o cíclica, mezclas de las mismas y derivados de las mismas.
- 30 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el tensioactivo no iónico se selecciona entre polisorbatos, copolímeros de polietilenglicol, copolímeros de polipropilen glicol y mezclas de los mismos.
7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polisacárido se selecciona entre quitosanos, dextranos, ácido hialurónico, carragenano, condroitina, keratano, ácido colomónico, xantano, ciclodextrinas, sales, derivados y mezclas de los mismos.
- 35 8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde el péptido de carga neta positiva se selecciona entre péptidos de señalización nuclear, péptidos de señalización mitocondrial, péptidos de reconocimiento de la superficie celular que comprenden la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico y péptidos de penetración celular.
- 40 9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde la molécula biológicamente activa se selecciona entre ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, polisacáridos, lípidos y mezclas de los mismos.
10. Sistema según la reivindicación 9, donde la molécula biológicamente activa se selecciona entre ADN, mARN, iARN, microRNA, oligonucleótidos y secuencia antisentido.
- 45 11. Procedimiento para la preparación de un sistema como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:
- 50 (i) preparar una disolución que comprende el lípido sólido a temperatura ambiente, en un disolvente orgánico,
 - (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico,
 - (iii) añadir la fase acuosa (ii) sobre la fase oleosa (i), sometiendo la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión,
 - 55 (iv) evaporar el disolvente orgánico,
- donde el polisacárido, y opcionalmente el péptido, pueden formar parte de la disolución (ii) o pueden formar parte de una disolución acuosa que se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente formadas tras la consecución de las etapas (i) a (iv).
- 60 12. Procedimiento para la preparación de un sistema como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:
- 65 (i) fundir el lípido sólido a temperatura ambiente,

ES 2 351 756 A1

- (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico,
- (iii) añadir la fase acuosa (ii) sobre el lípido fundido (i), sometiendo la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión,
- (iv) someter la emulsión (iii) a un proceso de homogeneización con una presión de al menos 30 psi y con al menos 1 ciclo,

5

10 donde el polisacárido, y opcionalmente el péptido, pueden formar parte de la disolución (ii) o pueden formar parte de una disolución acuosa que se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente formadas tras la consecución de las etapas (i) a (iv).

15

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que las nanopartículas lipídicas obtenidas tras la consecución de las etapas i) a iv) se ponen en contacto con una disolución que comprende una molécula biológicamente activa.

20

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que la molécula biológicamente activa se incorpora en la etapa (i) de preparación de la solución que comprende el lípido o en el lípido fundido, o bien en la etapa (ii) de preparación de la disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

25

15. Sistema de nanopartículas obtenible según el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 11-14.

30

16. Composición farmacéutica o cosmética que comprende el sistema de nanopartículas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10 ó 15.

35

17. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 ó 15, para su uso como medicamento.

40

45

50

55

60

65

70

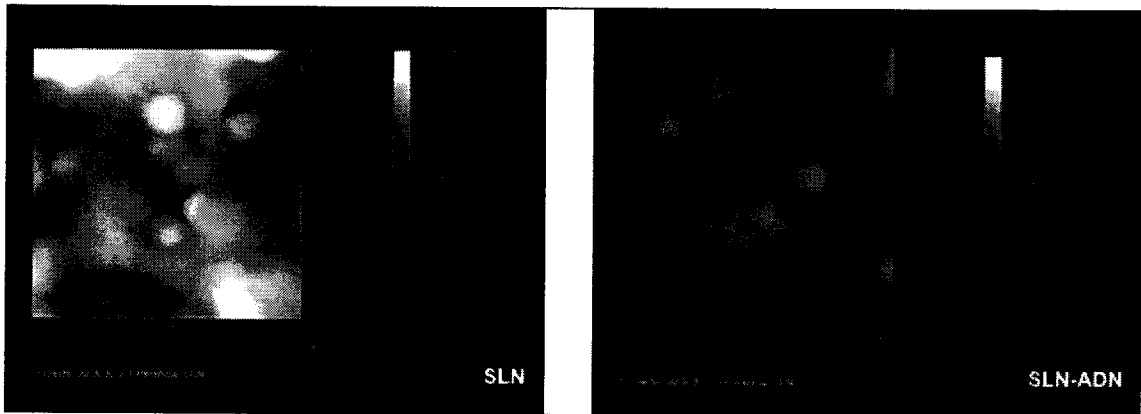


Figura 1A

Figura 1B



Figura 2

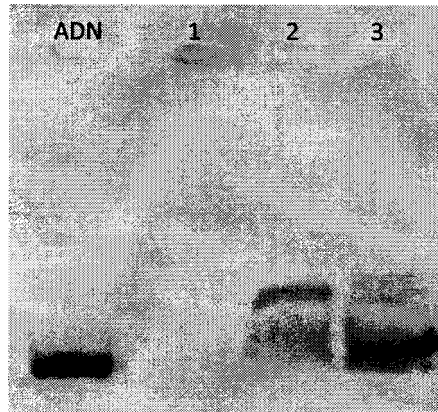


Figura 3

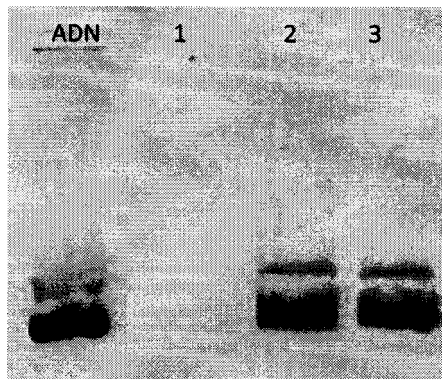


Figura 4

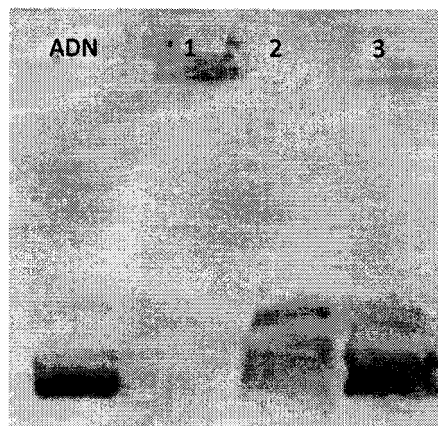


Figura 5

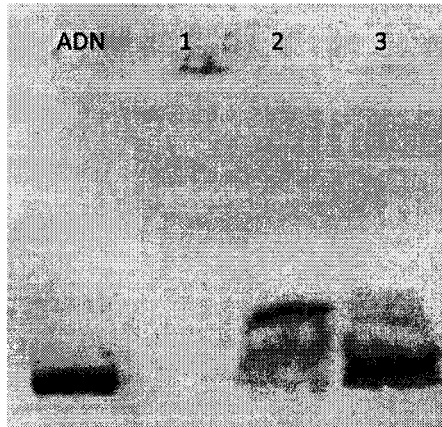


Figura 6

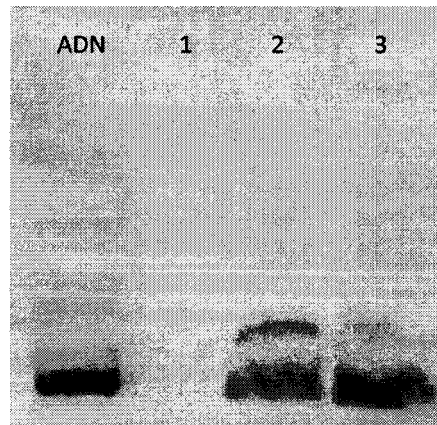


Figura 7

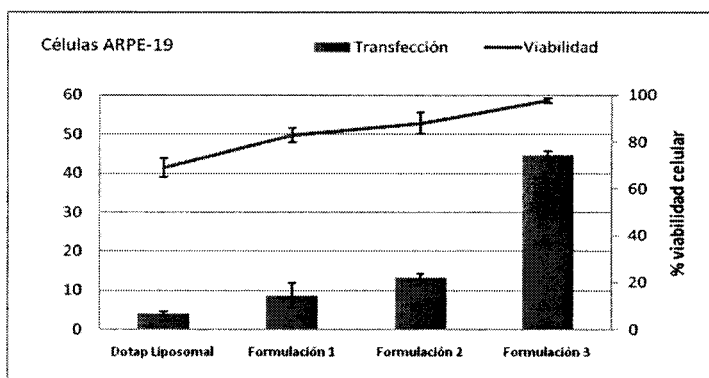


Figura 8

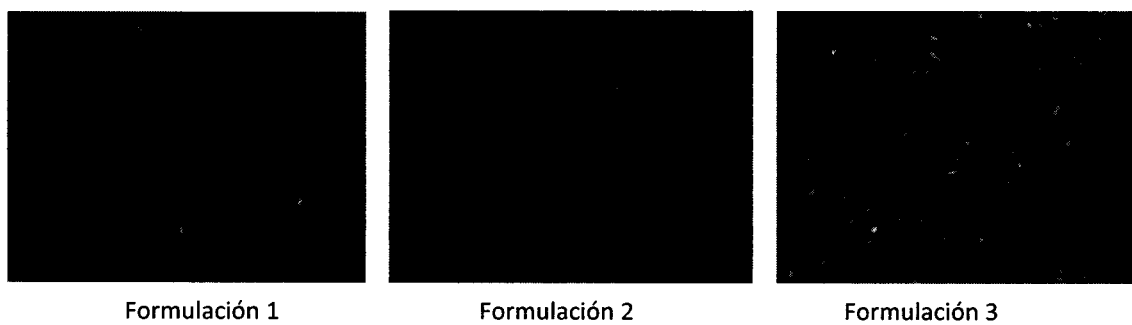


Figura 9

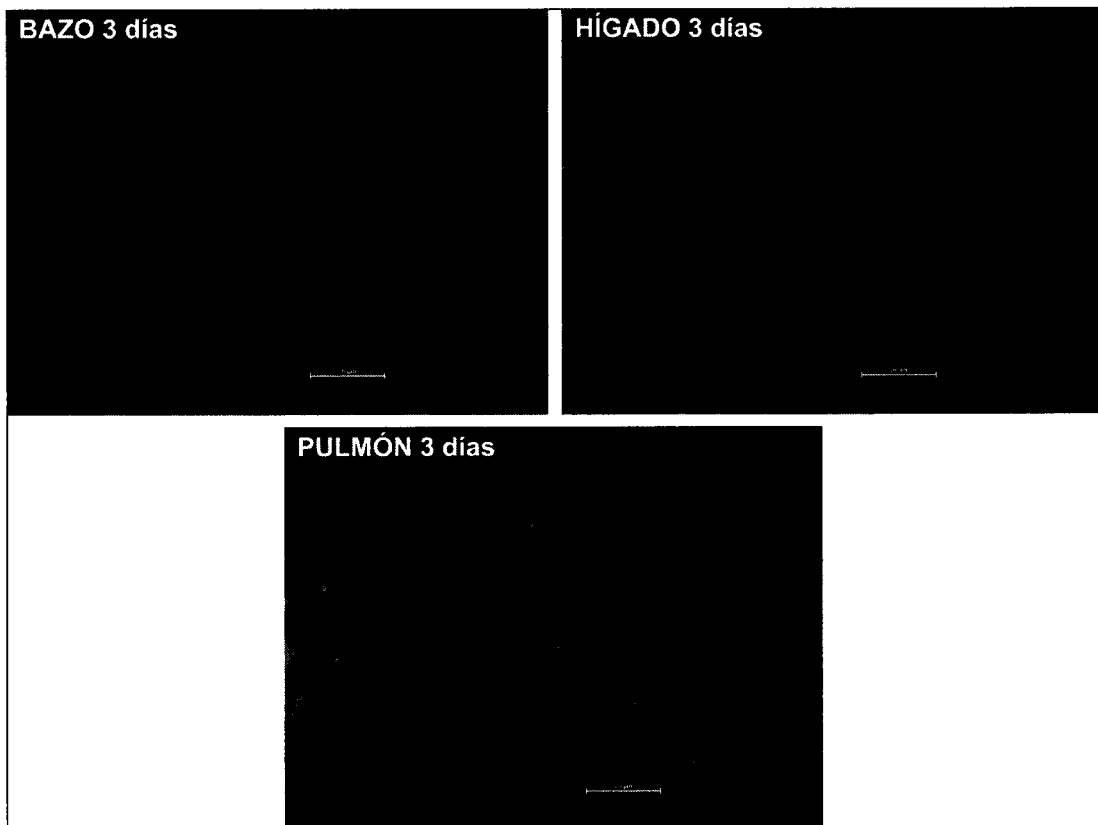


Figura 10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901664

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K9/51** (01.01.2006)
A61K48/00 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005041933 A1 (TEVA PHARMA et al.) 12.05.2005, todo el documento.	1-18
A	WO 2004082660 A1 (SALVONA LLC) 30.09.2004, todo el documento.	1-18
A	DEL POZO-RODRÍGUEZ A et al.: "Solid Lipid Nanoparticles: Formulation Factors Affecting Cell Transfection Capacity", International Journal of Pharmaceutics (2007) vol. 339 (1,2), pp.: 261-268, todo el documento.	1-18
A	WO 2007135164 A1 (ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOL et al.) 29.11.2007, todo el documento.	1-18
A	WO 2005120469 A1 (GASCO MARIA ROSA) 22.12.2005, todo el documento.	1-18
A	WO 2004096140 A2 (PENN STATE RES FOUND et al.) 11.11.2004, todo el documento.	1-18
A	WO 0006120 A1 (KOREA INST SCI & TECH et al.) 10.02.2000, todo el documento.	1-18

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
02.02.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

A61K

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, MEDLINE, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005041933 A1 (TEVA PHARMA et al.) 12.05.2005, todo el documento.	
D02	WO 2004082660 A1 (SALVONA LLC) 30.09.2004, todo el documento.	
D03	DEL POZO-RODRÍGUEZ A et al.: "Solid Lipid Nanoparticles: Formulation Factors Affecting Cell Transfection Capacity", International Journal of Pharmaceutics (2007) vol. 339 (1,2), pp.: 261-268, todo el documento.	
D04	WO 2007135164 A1 (ADVANCED IN VITRO CELL TECHNOL et al.) 29.11.2007, todo el documento.	
D05	WO 2005120469 A1 (GASCO MARIA ROSA) 22.12.2005, todo el documento.	
D06	WO 2004096140 A2 (PENN STATE RES FOUND et al.) 11.11.2004, todo el documento.	
D07	WO 0006120 A1 (KOREA INST SCI & TECH et al.) 10.02.2000, todo el documento.	

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

La solicitud reivindica un sistema para la liberación de moléculas biológicamente activas que contiene, al menos, un lípido sólido, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo no iónico y un polisacárido. El sistema puede contener, además, un péptido de carga neta positiva.

La solicitud reivindica, asimismo, un procedimiento para la elaboración de dicho sistema.

D01-D07 tan sólo reflejan el estado de la técnica anterior. Los documentos más cercanos serían D01 y D02. D01 describe una composición que comprende nano partículas. Contiene polisacárido o péptido, pero siempre por separado. El polisacárido no tiene las propiedades del de la solicitud. El resto de componentes sí son similares.

D02 se refiere a una composición que, aunque es similar a la de la solicitud, tiene unas características funcionales diferentes. Esto es porque aunque los componentes son análogos a los de la solicitud, el polisacárido no está incorporado en la composición de la nanopartícula, sino que forma parte de una microesfera que engloba a la nanopartícula.

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia.

Así, se considera que la invención reivindicada cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.