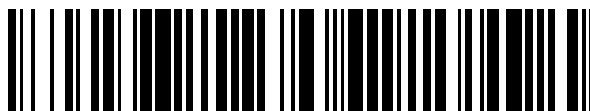


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 628**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03760766 .0**

96 Fecha de presentación: **20.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1513506**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54 Título: **SISTEMA DE VECTORIZACIÓN QUE COMPRENDE NANOPARTÍCULAS DE TAMAÑO HOMOGÉNEO DE AL MENOS UN POLÍMERO Y DE AL MENOS UN POLISACARIDO CARGADO POSITIVAMENTE Y SU PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN.**

30 Prioridad:
20.06.2002 FR 0207668

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
**BIOALLIANCE PHARMA
49, BOULEVARD DU GENERAL MARTIAL VALIN
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**ABOUBAKAR, Malam;
MAKSIMENKO, Andrei;
CHAUMONT, Christine y
POLARD, Valérie**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 628 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

Sistema de vectorización que comprende nanopartículas de tamaño homogéneo de al menos un polímero y de al menos un polisacárido cargado positivamente y su procedimiento de preparación

5 La invención se refiere al suministro de principios activos usados especialmente en el campo de los medicamentos de tratamiento preventivo, curativo o diagnóstico. Tiene más particularmente por objeto un sistema de suministro y de vectorización de sustancias de interés constituido por nanopartículas basadas en al menos un polímero, preferiblemente un poli(cianoacrilato de alquilo), y al menos un polisacárido cargado positivamente, preferiblemente un quitosano de bajo peso molecular, y sustancias de interés aniónicas, o que comprenden una región aniónica, adheridas o incorporadas al nivel de dichas nanopartículas.

10 La puesta a punto de nuevos sistemas de suministro o de liberación de principios activos tiene como objetivo primario el suministro controlado de un agente activo, especialmente farmacológico, a su sitio de acción a una velocidad y con una posología terapéuticamente óptimas (J. Kreuter, 1994). Se puede citar también la mejora del índice terapéutico, que puede obtenerse mediante la modulación de la distribución del principio activo en el organismo. La asociación de principio activo con el sistema de suministro permite especialmente su suministro
15 específico al sitio de acción o su liberación controlada después de la orientación al sitio de acción. La reducción de la cantidad de principio activo en los compartimentos en que su presencia no es deseable permite elevar la eficacia de dicho principio activo y reducir sus efectos secundarios tóxicos, hasta incluso modificar o restaurar su actividad.

Una de las cuestiones principales del suministro es su aplicación a la biología molecular y muy particularmente la aplicación a principios activos como ácidos desoxirribonucleicos (ADN), oligodesoxinucleótidos (ODN), péptidos y proteínas, cargados todos negativamente. La comprensión de las bases de la biología molecular en las enfermedades genéticas permite modular o reemplazar un gen disfuncional. El desarrollo de la terapia génica rutinaria en la práctica clínica depende de la posibilidad de administración por vía sistémica de forma repetida, de la capacidad de alcanzar una diana y de transfectar eficazmente células *in vivo* (Felgner, 1990, Kabanov y Alakhov, 1993, Crook, 1995, Douglas y Curiel, 1995, Lasic y Templeton, 1996) así como de la posibilidad de fabricar vectores
20 que sean capaces de trasladarse a escala industrial. Las técnicas de transfección *in vitro* usadas hasta ahora, como electroporación y coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, son enfoques cuya aplicación *in vivo* parece difícil (Fynan *et al.*, 1993).

Los sistemas usados actualmente para la transfección *in vivo* tienen en cuenta la carga natural negativa de ADN u ODN. Son sistemas víricos (Morgan y Anderson, 1993) o bien construcciones no víricas como lípidos catiónicos (Ledley, 1994, Zelphati y Szoka, 1996). Los vectores víricos son muy eficaces en términos de transfección *in vitro*, pero poseen limitaciones *in vivo* debido a su inmunogenicidad (Wilson *et al.*, 1990, Douglas y Curiel, 1995; Verma y Somia, 1997). Entre los vectores no víricos, los lípidos catiónicos tales como transfectamo (Behr *et al.*, 1989) presentan buenas propiedades de transfección, pero su aplicación *in vivo* está limitada por su toxicidad, la activación del complemento y su fuerte tropismo por hígado y pulmones.

35 Desde los estudios efectuados con poli-(1-lisina) a finales de los años 80 (Wu y Wu, 1987), se han estudiado varios polímeros catiónicos como vectores de transfección no víricos. Estos vectores incluyen polietilenimina (Boussif *et al.*, 1995; Remy *et al.*, 1998), polibreno (Mumper *et al.*, 1996) y dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) (Tang *et al.*, 1996).

Hasta ahora, la eficacia de la transfección con polímeros es relativamente baja y muchos de estos polímeros catiónicos han mostrado una toxicidad relativa con bajos potenciales de administración repetida por vía intravenosa. Los polímeros usados directamente con los principios activos, especialmente ADN, están limitados por su eficacia de transfección y consumen una gran cantidad de principio activo y por ello obligan a usar una gran cantidad de polímero que resulta tóxica. Los sistemas coloidales usados para el suministro especialmente de genes *in vivo* economizan más polímeros y principio activo.

45 Los sistemas coloidales de suministro de principios activos comprenden liposomas, microemulsiones, nanocápsulas, nanosferas, micropartículas y nanopartículas. Las nanopartículas presentan ventajas de orientación, modulación y distribución y de flexibilidad de formulación, y tienen una estructura polimérica que puede concebirse y realizarse de forma adaptada al fin perseguido. Se revelan muy particularmente prometedoras para obtener un mejor índice terapéutico en el sentido definido anteriormente, a causa de su aptitud para asegurar una liberación controlada, un suministro específico al sitio de acción o suministro orientado, que permite a la vez un aumento de la eficacia y una
50 reducción de los efectos secundarios tóxicos al nivel de otros órganos.

Entre estos, los poli(cianoacrilatos de alquilo) descritos en los documentos EP-B-0.007.895 (US-A-4.329.332 y US-A-4.489.055), FR 2.649.321-A, FR 2.724.935-A y EP-B-0.064.967 (US-A-4.913.908) son particularmente interesantes puesto que se observa rápidamente su bioerosión con respecto a otros polímeros biodegradables y se desarrolla durante periodos compatibles con las aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Las nanopartículas son vectores coloidales cuyo diámetro varía entre 10 nm y 1000 nm. Estas partículas están formadas por macromoléculas en las que la sustancia biológicamente activa se pliega, encapsula o adsorbe en la superficie. Las nanopartículas o nanoesferas se han descrito por Birrenbach y Speiser (1976) en términos de "nanoaglomerados" y

nanocápsulas y se califican por Kreuter y Speiser (1976) como “coadyuvantes” y “sistemas de suministro de sustancias activas” por Kreuter (1983).

5 Con el fin de aumentar la estabilidad de los oligonucleótidos, de aumentar su penetración en las células y de evitar la distribución no específica, se considera el uso de vectores particulares, como nanopartículas, como un enfoque de los más prometedores. Sin embargo, su uso ha estado limitado por la toxicidad de la sustancia usada para fijar el principio activo a la nanopartícula.

10 Las nanopartículas poliméricas más estudiadas son los poliisohexilcianoacrilatos (PIHCA). Sin embargo, estas nanopartículas presentan una carga negativa en superficie; se han combinado un copolímero catiónico (dietilaminoetil (DEAE)-dextrano) o un detergente hidrofóbico catiónico (bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)) con polialquilcianoacrilatos (PACA) con el fin de facilitar la asociación de los ODN mediante la formación de pares iónicos sobre las nanopartículas. Así, los ODN se han asociado eficazmente a nanopartículas de PACA que contenían un catión hidrofóbico tal como CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, Chavany *et al.*, 1992). El CTAB presenta problemas de toxicidad; Zobel *et al.*, 1987 han reemplazado al CTAB por DEAE-dextrano, que se ha introducido en el medio de polimerización antes de la formación de las nanoesferas. El DEAE-dextrano se ha comprobado igualmente tóxico.

El vector nanoparticulado ideal para el suministro de principios activos como ADN, ODN, péptidos y proteínas debe:

- poder formar un complejo con la molécula de interés teniendo en cuenta sus características fisicoquímicas y la sustancia elegida para fijar el principio activo, y debe adaptarse a la carga y a los datos de toxicidad,
- poder proteger al principio activo de la degradación durante su transporte por la circulación sanguínea,
- 20 - ser biocompatible (no tóxico, no inmunogénico y preferiblemente biodegradable),
- poder suministrar el principio activo al nivel del tejido diana en cantidad suficiente, y
- poder orientarse específicamente a un tipo celular.

Este fin se consigue gracias al uso de nanopartículas poliméricas, en particular de poli(cianoacrilatos de alquilo) asociados a uno o varios polisacáridos cargados positivamente.

25 La invención tiene por tanto como objeto un sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés terapéutico o diagnóstico, del tipo constituido por nanopartículas, caracterizado porque dichas nanopartículas presentan una distribución de tamaño homogénea y comprenden (i) al menos un polímero y (ii) al menos un polisacárido cargado positivamente no tóxico.

En el sistema según la invención, las sustancias de interés se internalizan o adsorben al nivel de dichas partículas.

30 El sistema de vectorización y suministro según la invención está muy particularmente adaptado a sustancias de interés aniónicas o que comprenden una región aniónica.

Preferiblemente, el polímero es un poli(cianoacrilato de alquilo) en el que el grupo alquilo, lineal o ramificado, comprende de 1 a 12 átomos de carbono.

35 El o los polisacáridos que entran en la composición de las nanopartículas de la invención no son tóxicos, a diferencia de las sustancias propuestas en la técnica anterior como CTAB o DEAE-dextrano.

Así, la invención se refiere muy particularmente a un polisacárido cargado positivamente que es lineal, se trata preferiblemente de un derivado de quitina y, muy preferiblemente, de quitosano o sus derivados siempre que estén cargados positivamente.

40 La quitina es un polisacárido que se encuentra abundantemente en la naturaleza por detrás de la celulosa. Su esqueleto está compuesto por azúcares de β 1,4-glucosamina con un alto grado de *N*-acetilación. Esta estructura es cercana a la de la celulosa, siendo la diferencia el reemplazo de la función hidroxilo por un agrupamiento amino (Roberts, 1992). Estos biopolímeros policatiónicos constituyen el exoesqueleto de crustáceos e insectos, pero están igualmente presentes en ciertos hongos (Roberts, 1992). El derivado principal de la quitina denominado quitosano se obtiene habitualmente mediante desacetilación alcalina. Los dos tipos de polímero (quitina y quitosano) se diferencian por su solubilidad o insolubilidad en una solución de ácido diluido (Roberts, 1992).

45 El quitosano se ha estudiado mucho en los campos farmacéutico y biomédico por sus propiedades biológicas favorables tales como su no toxicidad (Knapczyk *et al.*, 1984), su biocompatibilidad (Chandy y Sharma, 1990; Hirano *et al.*, 1990) y su biodegradabilidad (Struszczyk *et al.*, 1991). En el campo médico, el quitosano se ha descrito que posee propiedades farmacológicas interesantes tales como su actividad hipocolesterolemizante (Kobayashi *et al.*, 1979), sus propiedades cicatrizantes (Balassa y Grove, 1972), y sus actividades antiácidas y antiulcerosas (Hillyard *et al.*, 1964). Además, su carácter policatiónico le confiere la capacidad de asociarse fuertemente con células de

mamífero, permitiendo el uso potencial de su actividad hemostática (Fradet *et al.*, 1986) y su actividad espermicida (Smith, 1984).

5 El peso molecular de los polisacáridos usados en la invención se ha elegido cuidadosamente con el fin de obtener nanopartículas homogéneas y de tamaño suficientemente pequeño para facilitar su administración. Así, estos polisacáridos, y muy particularmente el quitosano o sus derivados, tienen una masa molecular inferior a 100.000 Da, preferiblemente inferior a 30.000 Da. Se ha sintetizado quitosano de 5.000, 10.000 y 30.000 Da en el marco de la invención.

A modo de ejemplo de derivados de quitosano, se pueden citar el quitosano pegilado, es decir quitosano al que se ha injertado polietilenglicol, o quitosano funcionalizado con ácido fólico para orientación a células cancerosas.

10 El sistema de suministro y vectorización según la invención permite modular el suministro de la sustancia de interés en función de la cantidad de polisacárido cargado positivamente en las nanopartículas. Esta modulación de la carga era imposible en la técnica anterior debido a la toxicidad de los detergentes como CTAB o los copolímeros como DEAE-dextrano. Así, en el sistema de la invención, la cantidad de polisacárido está comprendida entre 0,1 y 1% con respecto a la cantidad de polímero.

15 Las nanopartículas de la invención pueden comprender también al menos un compuesto apto para complejar la sustancia de interés. Se trata, por ejemplo, de un compuesto descrito en la patente francesa publicada con el nº 2.775.435. Ventajosamente, el compuesto apto para complejar con la sustancia activa es un oligosacárido cíclico, preferiblemente una ciclodextrina neutra o cargada, ramificada o polimerizada o modificada químicamente. Puede tratarse de una ciclodextrina modificada químicamente mediante la sustitución de uno o varios hidroxipropilos por

20 agrupamientos alquilo, arilo, arilalquilo, glucosídico o mediante esterificación con alcoholes o ácidos alifáticos.

El sistema de vectorización y de suministro según la invención está muy particularmente adaptado a sustancias de interés aniónicas o que comprenden una región aniónica. Así, puede tratarse de sustancias de interés que no están cargadas, o están cargadas positivamente, pero que están modificadas de modo que se confiera en total o en parte una carga negativa que permita su asociación con nanopartículas según la invención cargadas positivamente. La

25 sustancia de interés se fija en las nanopartículas de forma covalente o no.

Se pueden citar como compuestos químicos, por ejemplo, el ADN o los oligodesoxirribonucleótidos u oligorribonucleótidos, especialmente los anticodificantes, o ARN interferentes (ARNip), o incluso los péptidos, polipéptidos o proteínas. Los ácidos nucleicos son sustancias aniónicas, pero ciertos péptidos, polipéptidos o

30 proteínas son igualmente aniónicos o comprenden una región cargada negativamente. A modo de ejemplos de sustancias de interés susceptibles de asociarse con nanopartículas de la invención, se pueden citar insulina, calcitonina o triptorelina a pH superiores a su pHi.

Las nanopartículas según la invención presentan un diámetro homogéneo comprendido entre 10 y 300 nm en función del PM del quitosano y de la concentración usada. Pueden prepararse mediante técnicas de polimerización en emulsión (Couvreur *et al.*, 1979) del tipo descrito en la patente francesa nº 2.775.435, así como en la parte

35 experimental a continuación.

La invención tiene muy particularmente como objeto un procedimiento de preparación de estas nanopartículas que comprende la polimerización a pH ácido superior a 1 de monómeros en presencia del polisacárido cargado positivamente.

40 Preferiblemente, el polisacárido se añade al inicio de la polimerización y el pH ácido es superior a 3. Según una forma de realización muy preferida de este procedimiento, la polimerización se realiza en presencia de un compuesto retardante de la polimerización como SO₂ o hidroquinona, que se fija en los grupos OH del medio acuoso de polimerización o del polisacárido.

Se obtiene mediante el procedimiento anterior una suspensión de nanopartículas poliméricas y polisacáridicas cuya carga positiva depende de la cantidad de polisacárido añadida. La cantidad de polisacárido está ventajosamente

45 comprendida entre 0,01% y 5%, y preferiblemente comprendida entre 0,1% y 1% con respecto al peso de la suspensión.

La sustancia de interés catiónica puede añadirse en cualquier momento del procedimiento anterior. Efectivamente, la polimerización a un pH ciertamente ácido pero superior a 1 permite introducir desde el inicio del procedimiento las sustancias de interés sensibles a un pH demasiado ácido. La cantidad de sustancia de interés está ventajosamente

50 comprendida entre 0,5% y 50% con respecto al peso de la suspensión.

A modo de ejemplo específico, se puede citar el procedimiento siguiente:

Se añaden 100 µl de poliisohexilcianoacrilato que contiene de 0 a 20.000 ppm de SO₂ a una solución de ácido cítrico (con un pH que varía de 1 a 5) que contiene un 1% de tensioactivo no iónico, el poloxámero 188 y eventualmente un 0,5% de ciclodextrina y que contiene un 0,2% de quitosano de bajo peso molecular (5.000 o 10.000 Da).

Se puede recordar que el uso de quitosano para obtener nanopartículas cargadas positivamente ya se ha descrito en la técnica anterior (Yang S.C. *et al.*, 2000). Sin embargo, el procedimiento de la técnica anterior se realiza a un pH del medio de polimerización muy ácido (pH 1) al que los principios activos no son estables.

5 En el procedimiento según la presente invención, el pH del medio de polimerización está comprendido entre 2,5 y 5, en que los principios activos son estables. Además, el procedimiento descrito por Yang S.C. *et al.* emplea un quitosano de peso molecular superior a 30.000 Da. Ahora bien, el uso de quitosano de peso molecular superior a 10.000 Da presenta toxicidad (Richardson S.C.W., *et al.*, 1999). Por el contrario, las nanopartículas según la presente invención comprenden quitosano de bajo peso molecular (5.000 y 10.000 Da), lo que permite obtener además nanopartículas que presentan una distribución de tamaño monodispersada y por ello con una mejor tolerancia.

10 El procedimiento descrito por Yang S.C. *et al.* está limitado por la concentración de quitosano presente en el medio de polimerización, puesto que a una concentración de quitosano inferior a un 0,25%, las nanopartículas obtenidas son inestables. El procedimiento según la invención permite obtener nanopartículas estables para concentraciones de quitosano inferiores a un 0,25%.

15 El sistema de vectorización y suministro de una sustancia de interés según la invención puede presentarse en forma de una suspensión de nanopartículas, o en forma de liofilizado de nanopartículas. Permite una administración sin desnaturalización de la sustancia de interés por vía intravenosa, por vía oral o por vía local.

20 Aparecerán otras ventajas y características de la invención con los ejemplos siguientes referentes a la preparación de nanopartículas de la invención y a su capacidad de transportar oligonucleótidos, y en los que se hará referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- La figura 1 representa la toxicidad de diferentes preparaciones sobre células NIH 3T3 EWS-*Fli1*.
- La figura 2 representa la toxicidad de diferentes preparaciones sobre células NIH 3T3.
- La figura 3 representa la toxicidad de diferentes preparaciones sobre células IW 35.
- La figura 4 representa la toxicidad de diferentes preparaciones sobre células CEM 4FX.
- 25 - La figura 5 representa la toxicidad de NP de quitosano de 5 kDa y 5-10 kDa y de NP de CTAB sobre células CEM4FX después de 24 h de incubación.
- La figura 6 representa la adsorción del ODN EF3008AS sobre nanopartículas de quitosano de 5 kDa y nanopartículas de CTAB.
- La figura 7 representa la estabilidad del ON EF3008AS.
- 30 - La figura 8 muestra las nanopartículas de quitosano de 5 kDa con un ON de 11 unidades (D) y el ON OPC de 7 unidades (B) en células CEM4FX.
- La figura 9 muestra las nanopartículas de quitosano de 5 kDa con el ON Fluo de 11 unidades en células IW 35.
- La figura 10 muestra las nanopartículas de quitosano de 5 kDa (A) y 5-10 kDa (B) con el ON EFAS de 30 unidades.
- 35 - La figura 11 representa la penetración del plásmido marcado con rodamina en la transfección *in vitro* de células NIH-3T3 EWS-*Fli1* por complejos de plásmido-NP de quitosano.
- La figura 12 representa la expresión de β -gal en células NIH3T3 EWS/*Fli-1* injertadas en ratón atímico después de marcaje inmunológico con anticuerpo anti- β -gal. (A) Transfección con 10 μ g de plásmido pCMV β -gal, (B) transfección con 10 μ g de plásmido pCMV β -gal asociado con 60 μ g de NP de quitosano de 5 kDa.
- La figura 13 representa la localización del ON EF3008AS-FITC vectorizado por NP de quitosano de < 5 kDa (A) y quitosano de 5-10 kDa (B) en células NIH 3T3 EWS/*Fli-1* después de observación por microscopio confocal.
- 40 - La figura 14 representa la localización intracelular del ON EF3008AS-FITC vectorizado por NP de quitosano de < 5 kDa (A) y quitosano de 5-10 kDa (B) después del barrido de un campo de células por láser del microscopio confocal.
- La figura 15 representa la inhibición del crecimiento tumoral después de la administración intratumoral de: PBS, NP de quitosano de 5 kDa/ODN EF3008AS, NP de quitosano de 5 kDa/ODN de control y ODN EF3008AS a ratones atímicos irradiados que han desarrollado una forma subcutánea de sarcoma de Ewing.
- 45 - La figura 16 representa la inhibición del crecimiento tumoral después de la inyección intravenosa de NP de quitosano de 5 kDa/ODN EF3008AS (ON AS/NP), ODN EF3008AS (ON AS), ODN de control (ON CON), NP de quitosano de 5 kDa/ODN de control (ON CON/NP), NP de quitosano de 5 kDa (NP) y NaCl a ratones atímicos irradiados que han desarrollado una forma subcutánea de sarcoma de Ewing.

- La figura 17 representa la detección de la expresión de la proteína GFP en un tumor mediante la técnica de inmunohistoquímica: A (corte del tumor), B (corte del tumor después de la administración intratumoral de ARNip anticodificante), C (corte del tumor después de la administración intratumoral de ARNip de control), D (corte del tumor después de la administración intratumoral de ARNip anticodificante vectorizado por NP de quitosano de 5 kDa), E (corte del tumor después de la administración intratumoral de ARNip de control vectorizado por NP de quitosano de 5 kDa).

- La figura 18 representa la detección de la inhibición de la síntesis de ARNm de la proteína GFP mediante la técnica de transferencia Northern. El ARNm de GFP se ha normalizado mediante ARNm de 28S.

Ejemplo I: Estudio de la toxicidad comparada del quitosano de diferentes pesos moleculares y CTAB sobre diferentes líneas celulares.

1) Materiales y procedimientos

Se sembraron células NIH3T3 y NIH 3T3 EWS-Fli-1 (células adherentes) en placas de 6 pocillos a 100.000 células por pocillo en su medio de cultivo sin puromicina y células IW35 (células en suspensión) en placas de 12 pocillos a razón de 750.000 células por pocillo. Se ensayaron igualmente otras células CEM 4FX en suspensión y se sembraron a 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos.

Para los dos primeros tipos celulares, se siembran las células 24 horas antes de su transfección. Se elimina entonces el medio y se ponen en contacto 100 µl de solución del complejo a ensayar con células en 900 µl de medio.

Se han ensayado diferentes concentraciones de CTAB y quitosano de varios pesos moleculares.

Se usan dos testigos correspondientes a células en medio de cultivo por una parte y en medio de cultivo que contiene 100 µl de NaCl 150 mM por otra parte. Después de 24 horas de incubación, se efectúan medidas de citotoxicidad mediante un ensayo que mide la actividad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de células vivas mediante la oxidación de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; SIGMA) en formazano. La cantidad de formazano producida es directamente proporcional al número de células vivas metabólicamente activas. Se lavan las células con PBS y se añade 1 ml de medio. Se incuban a continuación las células a 37°C con 100 µl de una solución de MTT (5 mg/ml en PBS) durante 3 horas. Se añade a continuación 1 ml de una solución de lisis (10% de SDS, Tris 10 mM) a cada pocillo. Se incuban las células a 37°C durante la noche. Se homogeneiza el medio y se lee la densidad óptica a 560 nm (Dynatech MRX).

2) Resultados

Se representa la toxicidad de las diferentes preparaciones sobre diferentes células (NIH 3T3, NIH 3T3 EWS-Fli1, IW 35 y CEM 4FX) en función de la concentración de moléculas cargadas positivamente (figuras 1-4). Para las células NIH 3T3 con y sin EWS-Fli1 (células adherentes) (figuras 1-2), se constata una alta toxicidad del CTAB en comparación con quitosano de 5 o 10 kDa. Además, el quitosano de 5 kDa no es tóxico y estimula la viabilidad celular.

Para las células en suspensión (IW35 y CEM 4FX) (figuras 3 y 4), los dos tipos de quitosano de 5 y 10 kDa no presentan una toxicidad alta en comparación con CTAB, que para concentraciones muy bajas presentan toxicidades elevadas.

Ejemplo II. Formulación de nanopartículas cargadas positivamente en presencia de quitosano de diferentes pesos moleculares

Se preparan las nanopartículas mediante la técnica de polimerización en emulsión (Couvreur *et al.*, 1979). Se añaden 100 µl de poliisohexilcianoacrilato que contiene SO₂ (Monorex®) a una solución de ácido cítrico diluida a pH= 3 que contiene un 1% de tensioactivo no iónico y poloxámero 188, que contiene o no un 0,5% de ciclodextrina y que contiene un 0,2% de quitosano de bajo peso molecular (5.000 o 10.000 Da). La duración de la polimerización es de 6 horas. Después de la polimerización, se determinó el tamaño después de la dilución de las partículas en agua MilliQ y se determinó el potencial zeta después de la dilución de las partículas en NaCl 1 mM. La tabla 1 siguiente refiere el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas en función del peso molecular del quitosano.

Tabla 1

	Diámetro (nm)	Desviación típica	Índice de polidispersidad	Potencial zeta
NP de quitosano PM 5 kDa	58	16	0,025	+21
NP de quitosano PM 5-10 kDa	60	15	0,065	+22

El diámetro de las partículas no varía en función del PM del quitosano. Cualquiera que sea el PM del quitosano usado a la concentración de 0,2%, se obtienen nanopartículas muy pequeñas y monodispersadas como confirma el valor de índice de polidispersidad.

El potencial zeta de estas partículas es positivo y la carga es independiente del peso molecular del quitosano.

5 Ejemplo III. Estudio de la toxicidad comparada de nanopartículas cargadas con quitosano y CTAB

1) Materiales y procedimientos

Se sembraron las células CEM 4FX en suspensión a razón de 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se ensayaron diferentes concentraciones de nanopartículas que poseen cargas positivas mediante la adición de CTAB o quitosano de 5 kDa y 10 kDa.

10 Se usan dos testigos correspondientes a células en medio de cultivo por una parte y en medio de cultivo que contiene 100 µl de NaCl 150 mM por otra parte. Después de 24 horas de incubación, se efectúan las medidas de citotoxicidad mediante un ensayo que mide la actividad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de células vivas mediante la oxidación del MTT a formazano. La cantidad de formazano producida es directamente proporcional al número de células vivas metabólicamente activas. Se lavan las células con PBS y se añade 1 ml de medio. Se incuban a continuación las células a 37°C con 100 µl de una solución de MTT (5 mg/ml en PBS) durante 3 horas. Se añade a continuación 1 ml de una solución de lisis (10% de SDS, Tris 10 mM) a cada pocillo. Se incuban las células a 37°C durante una noche. Se homogeneiza el medio y se lee la densidad óptica a 560 nm (Dynatech MRX).

2) Resultados

20 En la línea celular CEM 4FX, las nanopartículas de quitosano de 5 y 10 kDa presentan toxicidad únicamente a partir de 10 µg/ml, mientras que las nanopartículas cargadas con CTAB son tóxicas a partir de 1 µg/ml (figura 5).

Ejemplo IV: Formulación de nanopartículas cargadas con oligonucleótidos

Los oligonucleótidos son macromoléculas cargadas negativamente capaces de interaccionar con superficies cargadas positivamente.

25 Se ha estudiado la formación de complejos de NP de quitosano con oligonucleótidos anticodificantes EF3008AS.

Los ON anticodificantes son secuencias nucleicas capaces de hibridar selectivamente con ARN mensajeros dianas celulares para inhibir su traducción a proteína. Estos ON forman con el ARNm diana, de manera local, regiones bicatenarias mediante interacciones de tipo Watson-Crick clásicas.

1) Materiales y procedimientos

30 Se diluyen las soluciones madre de nanopartículas (10 mg/ml) a una concentración final de 1 mg/ml en tampón Tris-HCl, pH= 7 a 10 mM de concentración final. Se realiza la adsorción de los oligonucleótidos sobre las nanopartículas de quitosano en NaCl 150 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente después de agitar con vórtice las soluciones durante aproximadamente 30 segundos. Se incuban a continuación los complejos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

35 Se efectúa la formación de complejos de nanopartículas CTAB-ODN en presencia de CTAB (a razón de 3 µmol de CTAB por 5 µg de NP) y de ODN en NaCl 150 mM. Se adsorben los ODN sobre NP de CTAB al cabo de 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Se realiza la preparación de los complejos en un volumen final de 200 µl.

Se mezclan diferentes cantidades de ODN de 30 unidades (EF3008AS) (20, 50, 100, 125, 150 y 200 µg) con 100 µl de NP de quitosano de 5 kDa y NP de quitosano de 5-10 kDa.

40 Las nanopartículas cargadas con ODN, igual que los ODN solos, se centrifugan a 35.000 rpm (Beckman Optima L80, rotor TW50, 1) durante 30 minutos a 4°C. Se calculó la cantidad de ODN adsorbida sobre las NP determinando la cantidad de ODN libre en los sobrenadantes (figura 6).

2) Resultados

45 Para relaciones de ON/NP de 0,2/1 y 0,5/1, se obtiene una adsorción de aproximadamente 100% del ON anticodificante EF3008AS sobre nanopartículas de quitosano de 5 kDa. Para nanopartículas de quitosano de 5-10 kDa, se obtiene una adsorción de 100% para una relación de ON/NP de 0,2/1; el porcentaje de adsorción es de 80% cuando se pasa a una relación de ON/NP de 0,5/1. Para estas dos relaciones de ON/NP (0,2/1 y 0,5/1), la adsorción del ON sobre nanopartículas de CTAB se sitúa como máximo a un 10%. Es importante observar que, para una relación de ON/NP de 1/1, se obtiene un porcentaje de adsorción de oligonucleótido de 80% con las nanopartículas de quitosano de 5 kDa (figura 6).

50

Ejemplo V: Estudio de la protección de los ODN adsorbidos sobre NP1) Materiales y procedimientos

- 5 Se determinó la integridad del ODN EF3008AS solo y asociado con NP de quitosano en 10% de suero de ternero recién nacido sin complemento. Se incuban los distintos complejos en 120 µl de NaCl 150 mM con 10% de suero de ternero recién nacido sin complemento. A diferentes tiempos de incubación, se extraen muestras de 15 µl, se mezclan con el mismo volumen de una solución de formamida/agua (4/1), 0,01% de azul de bromofenol y 0,01% de xileno-cianol y se congelan a -20°C. Se degradan los NP con NaOH a pH 12 durante 2 horas a 37°C. Se recuperan entonces los ODN mediante una doble extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se precipitan a continuación en 10 volúmenes de acetona que contienen un 2% de perclorato de litio durante 30 minutos a -20°C.
- 10 Se retoman a continuación los ODN en 5 µl de solución de formamida/agua (4/1), 0,01% de azul de bromofenol y 0,01% de xileno cianol, se calientan durante 5 minutos a 95°C y se ponen después en hielo. Se analizan en gel desnaturante con 20% de poliacrilamida, urea 7 M y TBE 1x. Se criba el gel con un Phosphoimager (Storm 840, Molecular Dynamics). Se cuantifica la degradación de los ODN efectuando la relación de señal de las bandas correspondientes a los ODN intactos y a los ODN degradados.

15 2) Resultados

La figura 7 muestra que hay una buena protección del ODN de 30 unidades por las NP de quitosano.

Ejemplo VI: Transfección de células humanas con NP de quitosano cargadas con ODN.1) Materiales y procedimientosa) Preparación de células

- 20 Se usaron células humanas CEM4FX. Se siembran 500.000 células en suspensión en placas de 12 pocillos (TPP, Suiza) en 850 µl de un medio RPMI que contiene un 10% de SVF (suero fetal de ternero).

b) Transfección de células

Se ponen en contacto 150 µl de la suspensión de nanopartículas preparada anteriormente con células durante 24 horas.

25 c) Fijación de células

Se fijan a continuación las células antes de poder efectuar una observación de fluorescencia. Al cabo de 24 horas de incubación de las células en presencia de nanopartículas, se añade 1 µg de yoduro de propidio a cada pocillo. Permite reconocer las células muertas al colorearlas de rojo.

- 30 Se centrifugan a continuación las células a 1000 rpm durante 5 min. Se extrae el sobrenadante y se lavan las células una vez más con PBS. Se añaden entonces 200 µl de PBS que contiene 4% de formaldehído y se dejan las células a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavan entonces las células dos veces con PBS 0,1X. Se efectúa igualmente otro lavado con agua estéril para terminar. Se añaden 20 µl de poli-lisina al final. La observación de las células se hace con microscopio equipado con un filtro a 480 nm.

2) Resultados

- 35 Se efectúa cada una de las observaciones de las figuras 8, 9 y 10 para los dos tipos de oligonucleótidos de 7 bases y 11 bases.

Las células en presencia de nanopartículas de quitosano de 5 kDa-ODN son muy fluorescentes y no es visible ninguna toxicidad. En presencia de la formulación de nanopartículas de quitosano de 5 kDa-Cyd-ODN, son igualmente fluorescentes, pero son visibles varias células muertas.

- 40 Las nanopartículas de quitosano de 10 kDa-Cyd-ODN presentan igualmente una buena fluorescencia, pero también una toxicidad ligeramente mayor que las nanopartículas de 5 kDa-Cyd-ODN. En presencia de nanopartículas de 30 kDa-Cyd-ODN, las células son igualmente muy fluorescentes, pero el número de células muertas es aún mayor que en los dos casos precedentes.

- 45 En el caso de células incubadas en presencia de nanopartículas de CTAB-Cyd-ON, la fluorescencia es baja y la toxicidad muy alta. El complejo CTAB-ODN no muestra ninguna fluorescencia celular.

En el caso de células incubadas en presencia de citofectina-ODH, no se observa ninguna fluorescencia celular.

Ejemplo VII: Transfección *in vitro* de células NIH-3T3 EWS-Flil por complejos de plásmido-NP de quitosano1) Materiales y procedimientos

a) Plásmido acoplado con rodamina

Se marcan 10 µg de plásmido de β-galactosidasa con un fluoróforo rojo Oregon Green 546 (ULYSIS® Nucleic Acid Labeling Kits, Molecular Probes). Este fluoróforo da una fluorescencia roja (la Ex/Em es de 555/570).

5 Se mezclan 1 µg de plásmido marcado y 3 µg de plásmido no marcado con NP de quitosano en 200 µl de NaCl 150 mM, se mezclan con vórtice y entonces se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se siembran células NIH-3T3 *EWS/Fli1* adherentes en placas de 6 pocillos (TPP, Suiza) 24 horas antes de la transfección con el fin de alcanzar un 60-70% de confluencia.

10 30 minutos antes de la transfección, se lavan las células con 2 ml de PBS 1x por pocillo y se añaden entonces 800 µl de DMEM que contiene un 2% de SVF a cada pocillo. Se ponen en contacto los complejos de células NIH-3T3 *EWS-Fli1* (200 µl) durante 16 horas a 37°C. Se presentan las imágenes de las células fluorescentes en la fotografía (figuras 11B y 11D).

2) Resultados

Se observa fluorescencia de las células cuando se acoplan con nanopartículas de quitosano (figuras 11B y 11D).

15 **Ejemplo VIII: Inducción de la expresión *in vivo* de β-galactosidasa por el plásmido pCMVβ-gal vectorizado por NP de quitosano de 5 kDa**

1) Materiales y procedimientosa) Tratamiento de los animales

20 Se obtienen las células EWS-Fli1 mediante transfección de células NIH 3T3 con el oncogén EWS-Fli1. Se ponen a continuación en cultivo. Cuando las células han alcanzado un 70% de confluencia, se ponen en suspensión en PBS a una concentración de $6,5 \times 10^6$ células/ml. Estas células se inoculan a continuación a ratones atímicos por vía subcutánea a razón de $1,3 \times 10^6$ células/ratón. 7 días después de la inoculación de las células (el tumor se vuelve visible a simple vista), se tratan los animales con 100 µl de NP de quitosano de 5 kDa (60 µg) asociado con 10 µg de plásmido pCMVβ-gal o bien con 100 µl de plásmido pCMVβ-gal (10 µg). 24 horas después del tratamiento, se extrae el tumor para un estudio histológico después de inmersión en Glyo-Fixx (Shandon).

25 b) Detección de la expresión de GFP en el tumor mediante la técnica de inmunohistoquímica

30 Se vierten los fragmentos de tumor en parafina y se marcan mediante una solución de hematoxilina-eosina-safranina. La proteína β-gal se detecta en un corte del fragmento de tumor de 4 µm por un anticuerpo anti-β-gal (Clontech) (1:30) seguido por el kit Power Vision Histostaining (Immuno Vision Technology, CA) después del contramarcaje; las muestras se observan al microscopio (Zeiss) asociado con una cámara CDD Camera Imaging System (Sony).

2) Resultados

Se observa la actividad β-gal después de 24 horas solo cuando los animales se transfectan con el plásmido pCMVβ-gal asociado con NP de quitosano de 5 kDa (figura 12B), mientras que cuando los animales se transfectan con el plásmido pCMVβ-gal solo, no se observa actividad β-gal (figura 12 A).

35 **Ejemplo IX: Penetración intracelular de ODN anticodificantes vectorizados por nanopartículas de quitosano de 5 y 10 kDa en células NIH 3T3 EWS/Fli-1**

1) Materiales y procedimientos

40 Se siembran células NIH 3T3 EWS/Fli-1 24 h antes de su transfección en un medio de cultivo sin puomicina en cámaras de cultivo montadas sobre láminas (Labtek® de 4 pocillos, Nunc Inc.) a razón de 100.000 células por pocillo. Se aclaran las células con PBS y se incuban durante 24 h en 400 µl de medio OPT1-MEM1 suplementado con 2,5% de SVF, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml en presencia de diferentes complejos de NP de quitosano:ODN-FITC a relaciones en masa de 5:1, 10:1 y 20:1. Estos complejos se preparan en NaCl 150 mM para un volumen final de 100 µl. Se usaron dos testigos correspondientes por una parte a células incubadas con el ODN As-FITC libre (1 µg) y por otra parte a células incubadas con 1 nmol de fluoresceína (Aldrich). Se visualiza la penetración del ODN AS-FITC en las células por microscopía confocal con la ayuda de un aparato Leica TCS NT (Leica) montado sobre un microscopio inverso Leica DM IRB/E.

2) Resultados.

50 No se observó ninguna célula fluorescente después de su incubación con FITC solo y ODN AS-FITC no vectorizado. Las imágenes de las figuras 13A y 13B presentan un campo de células incubadas respectivamente con complejos de NP de quitosano de 5 kDa:ODN AS-FITC y NP de quitosano de 10kDa::ODN AS-FITC en relación (5:1). Muestran que la fluorescencia está dispersada en el citosol cuando los ODN-FITC están vectorizados por NP de quitosano de

5 kDa y concentrada al nivel del núcleo en el caso de NP de quitosano de 10 kDa. Las curvas de las figuras 14A y 14B presentan la suma de intensidades de fluorescencia registradas en diferentes planos Z de la célula. Para una profundidad de 0 a 10 μm , la fluorescencia se sitúa al nivel de la membrana apical de las células. Una profundidad de 8 a 9 μm corresponde a su membrana basal. Entre 1 y 8 μm , la fluorescencia se localiza al nivel intracelular. Estas curvas muestran que, para los dos tipos de NP de quitosano de relación NP de quitosano:ODN 5 :1, la fluorescencia es menor al nivel de la membrana basal de las células que en la membrana apical expuesta al medio de cultivo que contiene los ODN-FITC. Para los dos tipos de quitosano a relación de NP de quitosano:ODN (5 :1), la fluorescencia está localizada mayoritariamente en la fracción intracelular. Estas curvas confirman que los ODN AS penetran en las células. La intensidad de fluorescencia en el interior de las células es mayor cuando el ODN-FITC está vectorizado por NP de quitosano de 5 kDa. La localización celular de la fluorescencia es la misma para las relaciones de NP de quitosano:ODN (10 :1) y (20 :1) que la relación (5 :1) para los dos tipos de NP de quitosano.

Ejemplo X: Inhibición del crecimiento tumoral después de la administración intratumoral de NP de quitosano a ratones atímicos que han desarrollado la forma subcutánea de sarcoma de Ewing.

1) Materiales y procedimientos

Se irradian 35 ratones atímicos hembra de 6-8 semanas de edad a 5 Grey. 24 horas después de la irradiación, los ratones reciben por vía subcutánea en el flanco derecho 200 μl de una suspensión de células NIH 3T3 EWS-Fli a 5×10^6 células/ml en PBS. Los animales desarrollan un tumor al cabo de 14-21 días. Se constituyen 4 grupos de 7 animales (grupo de PBS, grupo de ODN EF3008AS, grupo de NP de quitosano de 5 kDa ODN EF3008AS y grupo de NP de quitosano de 5 kDa:ODN de control. Se aleatorizan los grupos y el tratamiento comenzará cuando el tumor haya alcanzado los 2 mm^3 . El tratamiento consiste en cinco administraciones intratumorales de productos con un intervalo de dos días. Se evaluará la eficacia de los tratamientos mediante la medida del crecimiento tumoral de los animales tratados con respecto a los testigos. Se evaluará el crecimiento tumoral por el volumen tumoral (VT). El VT se calculará como sigue: $VT (\text{mm}^3) = a^2 \times b / 2$ en que a y b representan respectivamente el diámetro menor y mayor del tumor. Se realiza el análisis estadístico de los resultados con la ayuda del software informático StatView® (Abacus Concepts, Berkeley, EE.UU.).

2) Resultados

Los resultados de inhibición del crecimiento tumoral (figura 15) muestran una inhibición del crecimiento cuando los animales se tratan con el ODN EF3008AS y los NP de quitosano de 5 kDa:ODN EF3008AS. Sin embargo, se observa una inhibición del crecimiento mayor cuando los animales se tratan con NP de quitosano de 5 kDa:ODN EF3008AS con respecto a los animales que recibieron ODN EF3008AS. Los animales testigo que recibieron PBS o NP de quitosano de 5 kDa:ODN de control muestran una baja inhibición del crecimiento tumoral.

Ejemplo XI: Inhibición del crecimiento tumoral después de la administración intravenosa del tratamiento a ratones que desarrollaron la forma subcutánea de sarcoma de Ewing

1) Materiales y procedimientos

Se irradian 36 ratones atímicos hembra de 6-8 semanas de edad a 5 Grey. 24 horas después de la irradiación, los ratones reciben por vía subcutánea en el flanco derecho 200 μl de una suspensión de células EWS-Fli a 5×10^6 células/ml en PBS. Los animales desarrollan un tumor al cabo de 10-20 días. Se constituyen 6 grupos de 6 animales (grupo de NP de quitosano de 5 kDa:ODN EF3008AS(ON AS/NP), ODN EF3008AS (ON AS), ODN de control (ON CON), NP de quitosano de 5 kDa:ODN de control (ON CON/NP), NP de quitosano de 5 kDa (NP) y 0,9% de NaCl (NaCl)). Se aleatorizan los grupos y el tratamiento comenzará cuando el tumor haya alcanzado los 10-40 mm^3 . El tratamiento consiste en cinco administraciones intravenosas de productos con un intervalo de dos o tres días. Se evaluará la eficacia de los tratamientos al cabo de 15 días mediante la media de las relaciones entre la medida del volumen tumoral en J14 y la medida del volumen tumoral en J1 de los grupos de animales tratados con respecto a los grupos testigo. El volumen tumoral se calcula como en el ejemplo X.

2) Resultados

Los resultados del crecimiento tumoral (figura 16) muestran una inhibición del crecimiento cuando los animales se tratan con ODN EF3008AS (grupo ON AS) y NP de quitosano de 5 kDa:ODN EF3008AS (ON AS/NP). Sin embargo, se observa una inhibición del crecimiento tumoral mayor cuando los animales se tratan con NP de quitosano de 5 kDa ODN EF3008AS (grupo ON AS/NP) con respecto a los animales que recibieron ODN EF3008AS sin NP de quitosano (grupo ON AS). Los animales de los grupos de control que recibieron NaCl, NP de quitosano solo (grupo de NP) u ODN de control con o sin NP de quitosano (grupos ON CON/NP y ON CON respectivamente) muestran una baja inhibición del crecimiento tumoral.

Ejemplo XII: Inhibición de la expresión de la proteína GFP e inhibición de la expresión de ARNm de la proteína GFP *in vivo* por ARNip vectorizado por nanopartículas.

1) Materiales y procedimientos

5 Se extraen las células adherentes HeLa transfectadas con GFP (HeLa-GFP) en cultivo de monocapa cuando alcanzan un 70% de confluencia y se vuelven a poner en suspensión en PBS a razón de 1×10^7 células/ml. Se administran las células a continuación por vía subcutánea al flanco derecho de ratones atímicos a razón de 2×10^6 células/ratón. 7 días después de la inoculación de las células, se reparten los animales en diferentes grupos y se tratan mediante la administración intratumoral de diferentes preparaciones de la forma siguiente:

10 Grupo 1 (100 μ l de una preparación que contiene 10 μ g de ON GFP bicatenario diana del ARNip), grupo 2 (100 μ l de ARNip de control solo), grupo 3 (100 μ l del ARNip de control vectorizado con 10 μ g de NP de quitosano de 5 kDa), grupo 4 (100 μ l de ON anticodificante de GFP solo), grupo 5 (100 μ l de ON anticodificante de GFP vectorizado por NP de quitosano de 5 kDa). 24 horas después del tratamiento, se extraen los tumores y se dividen en dos partes. La parte destinada al estudio histológico se sumerge en una solución de GlyoFixx (Shandon) y la parte usada para la transferencia Northern se conserva en nitrógeno líquido.

15 a) Detección de la expresión de GFP en el tumor mediante la técnica de la inmunohistoquímica

Se vierten los fragmentos tumorales en parafina y se marcan mediante una solución de hematoxilina-eosina-safranina. Se detecta la GFP en un corte de 4 μ m por un anticuerpo anti-GFP (Clontech) (1:30) y, seguido del kit Power Vision Histostaining (ImmunoVision Technology CA) después del contramarcado, se observan las muestras al microscopio (Zeiss) asociado con una cámara CDD Camera Imaging System (Sony).

20 b) Detección de la expresión de ARNm de GFP en el tumor mediante técnicas de transferencia Northern

25 Se trituraron los fragmentos tumorales en una solución que contenía 400 μ l de tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de sodio 25 mM (pH 7), 0,5% de sarcosilo y β -mercaptoetanol 0,1 M a 0°C. Después de la homogeneización, se extrajo el ADN con fenol como sigue: se añaden 40 μ l de solución de acetato de sodio 2 M (pH 4) a 400 μ l de H₂O saturada con fenol y 120 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Se centrifuga la mezcla a 1300 rpm durante 15 minutos. Se precipitan 300 μ l de la fase acuosa con 300 μ l de isopropanol a -20°C. Se lava el sedimento así obtenido con etanol al 70%. Después del secado, se retoma el sedimento con 10 μ l de H₂O destilada. Se realizó la electroforesis de 2 μ g de ARN total sobre gel de agarosa al 1% en tampón MOPS que contenía un 6,3% de formalina. Se transfirió el ARN a una membrana de nitrocelulosa (BA-S85, Schleicher&Shuell) en tampón SSC (10X). Se detectó el ARNm de GFP mediante la técnica de transferencia Northern con un fragmento de ADNc de GFP de 770 pb marcado con α^{32} P-dCTP 300 Ci/mM (ICN, Francia) y el sistema de marcaje Prime-a-gene (Promega). Después del lavado, se analizó la membrana de nitrocelulosa en un Phosphorimager Storm 840 (Molecular Dynamic).

2) Resultados

35 Se observa la inhibición de la síntesis de GFP solo cuando el ARNip está vectorizado con NP de quitosano de 5 kDa como muestra la figura 17 (D). En todos los demás casos, no se observa inhibición de GFP (figuras 17 A, B, C y E). La actividad anticodificante del ARNip vectorizado por NP de quitosano de 5 kDa se confirma mediante la técnica de transferencia Northern. Se observa una inhibición de la síntesis de ARNm de GFP de un 50% al cabo de 24 horas cuando el ARNip está vectorizado por nanopartículas (figura 18). Estos resultados demuestran que el ARNip vectorizado por nanopartículas interfiere con el gen de expresión de GFP *in vivo*.

40 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Balassa, L.L. y Grove, B., 1972. patente de EE.UU. 3.632.754.

Behr, J.P., Demeneix, B., Loeffler, J.-P., Perez-Mutul, J., 1989. "Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986.

45 Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995. "A versatile vector for gene and oligonucleotide delivery into cells in culture and in vivo: polyethylenimine". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-7310.

Chandy, T. y Sharma C.P., 1990. Biomat. Art. Cells. Art. Org., 18, 1.

Chavany, C., Le Doan T., Couvreur, P., Puisieux, F., Helene, C., 1992. "Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides", Pharm. Res. 9, 441-449.

50 Crook, S.T., 1995. "Delivery of oligonucleotides and polynucleotides". J. Drug Targeting 3, 185-190.

Douglas, J.T., Curiel, D.T., 1995. "Targeted gene therapy". Tumor Targeting 1, 67-84.

- Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A.M., Remy, J.S., 1998, "Chitosan-Based Vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability". Pharm. Res. 15, 1332-1339.
- Felgner, P.L., 1990. "Particulate systems and polymers for in vitro and in vivo delivery of polynucleotides". Adv. Drug Deliv. Rev. 5, 163-187.
- 5 Fernandez-Urrusuno, R., Calvo P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. y Alonso, M.J. 1999. "Enhancement nasal absorption of Insulin Using Chitosan", Pharm. Res., 16, 1576-1581.
- Fradet, G., Brister, S., Mulder, D.S., Lough, J. y Averbach, B.L., 1986 en "Chitin in nature and Technology" (R. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G.W. Gooday, eds), Plenum Press, Nueva York, pág. 443.
- 10 Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L., 1993. "DNA vaccines: protection immunization by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11478-11482.
- Hillyard, I.W., Doczi, J., y Kiernan, P.B., 1964. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 1108.
- Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. y Nonaka, I., 1990, en "Progress in Biomedical polymers" (C.G. Gebelein and R.L. Dunn, ed), Plénum Press, Nueva York, pág. 283.
- 15 Kabanov, A.V., Alakhov, V.Y., 1993. "Micelles and amphiphilic block copolymers as vehicles for drug delivery". En: Alexandris, P., Lindman, B. (Eds.), "Amphiphilic block copolymers: Self Assembly and Applications". Elsevier, Amsterdam, pág. 1-30.
- 20 Knapczyk, J., Krowczynski, L., Pawlik, B. y Liber Z., 1984, en "Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications" (G. Skjak-Barek, T. Anthonsen and Sandford P., ed., Elsevier Applied Science, Londres, pág. 665.
- Kobayashi, T., Otsuka, S. y Yugari, Y., 1979. Nutr. Rep. Int., 20, 677.
- Kreuter, J. "Colloidal Drug Delivery Systems", Marcel Decker, Nueva York, 1994, 219-342.
- Lasic, D., Templeton, N., 1996. "Liposomes in gene therapy". Adv. Drug Deliv. Rev. 20, 221-266.
- Ledley, F.D., 1994. "Non-viral gene delivery". Curr. Opin. Biotechnol. 5, 626-636.
- 25 Morgan, R.A., Anderson, W.F., 1993. "Human gene therapy". Annu. Rev. Biochem. 62, 191-217.
- Mumper, R.J., Duguid, J.G., Anwer, K., Barron, M.K., Nitta, H., Rolland, A.P., 1996. "Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle". Pharm. Res. 13, 701-709.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. "Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines". Pharm. Res. 14, 1431-1436.
- 30 Calvo P., Boughaba, A.S., Appel, M., Fattal, E., Alonso, M.J., Couvreur, P., 1998. "Oligonucleotide-chitosan nanoparticles as new gene therapy vector". "Proceed. 2nd World Meeting APGI/APV", París, pág. 1111-1112.
- Remy, J.S., Abdallah, B., Zanta, M.A., Boussif, O., Behr, J.-P., Demeneix, B., 1998. "Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines". Adv. Drug Deliv. Rev. 30, 85-95.
- 35 Rha, C.K., Rodriguez-Sanchez, D. y Kienzle-Sterzer, 1984. En "Biotechnology of Marine Polysaccharides" (R.R. Colwell, E.R. Pariser, A.J. Sinskey, ed.), Hemisphere Publishing, Washington, pág. 284.
- Richardson, C.W., Kolbe, H.V.J., Duncan, R., 1999. "Potential of low molecular mass Chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA". Int. J. Pharm., 178, 231-243.
- Roberts, G.A.F., 1992. En "Chitin Chemistry" (G.A.F. Roberts ed.), Mac Millan Press, Hounmills, pág. 274.
- Roberts, G.A.F., en "Chitin chemistry" 1992, (G.A.F. Roberts ed.), Mac Milan Press, Houndmills, pág.1.
- 40 Smith, R.L., 1984. patente de EE.UU. 4.474.769.
- Struszczyk, H., Wawro, D. y Niekraszewicz, A., 1991. En "Advances in chitin and Chitosan" (C.J. Brine, P.A. Sandford, and J.P. Zikakis, ed.), Elsevier Applied Science, Londres, pág. 580.
- Tang, M.X., Redmann, C.T., Szoka, F.C., 1996. "In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers". Bioconjugate Chem. 7, 703-714.
- 45 Verma, I.M., Somia, N., 1997. "Gene therapy-promises, problems and prospects". Nat. Med. 389, 239-242.

Wilson, J.A., Ping, A.J., Krauss, J.C., Mayo-Bond, L., Rogers, C.E., Anderson, D.C., Tod III, R.F., 1990. "Correction of CD18 deficient lymphocytes by retrovirus mediated gene transfer". Science, 248, 1413-1416.

WU, G., Wu, C., 1987. "Receptor-mediated in vitro gene transformation by soluble DANN carrier system". J. Biol. Chem. 262, 4429-4432.

- 5 Zelphati, O., Szoka, F.C. Jr., 1996. "Liposomes as carriers for intracellular delivery of antisense oligonucleotide: real or magic bullet ?" J. Control. Release 41, 99-119.

Zobel, H.P., Kreuter, J., Werner, D., Noe, C.R., Kumel, G., Zimmer, A., 1997. "Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotide", Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7, 483-493.

- 10 Yang, S.C., Ge, H.X., Hu, Y., Jiang, X.Q., Yang, C.Z., 2000. "Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan", Colloid Polym. Sci. 278, 285-292.

Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Baudin, P., Speiser, P., 1979. "Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties". J. Pharm. Pharmacol., 31, 331-332.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés terapéutico o de diagnóstico del tipo constituido por nanopartículas, **caracterizado porque** dichas nanopartículas presentan una distribución de tamaño homogénea y comprenden (i) al menos un polímero y (ii) al menos un polisacárido cargado positivamente no tóxico.
- 5 2. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichas sustancias se internalizan o adsorben al nivel de dichas nanopartículas.
3. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** las sustancias de interés son aniónicas o comprenden una región aniónica.
- 10 4. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el polímero es un poli(cianoacrilato de alquilo) en el que el grupo alquilo, lineal o ramificado, comprende de 1 a 12 átomos de carbono.
5. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el polisacárido cargado positivamente es quitosano o uno de sus derivados.
- 15 6. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el polisacárido cargado positivamente, muy particularmente quitina o uno de sus derivados, tiene una masa molecular inferior a 100.000 Da, preferiblemente inferior a 30.000 Da.
7. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** las nanopartículas comprenden al menos un compuesto apto para complejar las sustancias de interés.
- 20 8. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según la reivindicación 7, **caracterizado porque** el compuesto apto para complejar las sustancias de interés es un oligosacárido cíclico, preferiblemente una ciclodextrina neutra o cargada, nativa, ramificada o polimerizada o modificada químicamente.
- 25 9. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las sustancias de interés se eligen del grupo de compuestos químicos que comprende ADN u oligodesoxirribonucleótidos u oligorribonucleótidos, especialmente anticodificantes, o ARN interferente (ARNip), o incluso péptidos, polipéptidos o proteínas.
10. Sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las nanopartículas presentan un diámetro homogéneo comprendido entre 10 y 300 nm.
- 30 11. Procedimiento de preparación de nanopartículas que entran en la composición de un sistema de vectorización y de suministro de sustancias de interés según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** comprende la polimerización a pH ácido superior a 1 de monómeros en presencia del polisacárido cargado positivamente para obtener una suspensión de nanopartículas.
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado porque** el polisacárido se añade al inicio de la polimerización.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 o 12, **caracterizado porque** el pH ácido es superior a 3.
- 40 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado porque** la polimerización se realiza en presencia de un compuesto retardante de la polimerización como SO₂ o hidroquinona, que se fija en los grupos OH del medio acuoso de polimerización o del polisacárido.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado porque** la cantidad de polisacárido está ventajosamente comprendida entre 0,01% y 5%, y preferiblemente entre 0,1 y 1%, con respecto al peso de la suspensión.
- 45 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 15, **caracterizado porque** comprende la adición de poliisohexilcianoacrilato que contiene SO₂ en una solución de ácido cítrico a un pH comprendido entre 1 y 5 que contiene un tensioactivo no iónico, eventualmente ciclodextrina y quitosano de bajo peso molecular (5.000 o 10.000 Da).
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 16, **caracterizado porque** comprende la adición de las sustancias de interés al mismo tiempo que el polisacárido.
- 50 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 16, **caracterizado porque** comprende la adición de las sustancias de interés después de la formación de las nanopartículas.

19. Una suspensión de nanopartículas susceptible de obtenerse mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, **caracterizado porque** comprende de 0,01% a 5%, en particular entre 0,1% y 1%, de polisacárido cargado positivamente con respecto al peso de la suspensión.
- 5 20. Una suspensión de nanopartículas según la reivindicación 19, **caracterizada porque** comprende de 0,5 a 50% de sustancias de interés con relación al peso de la suspensión.

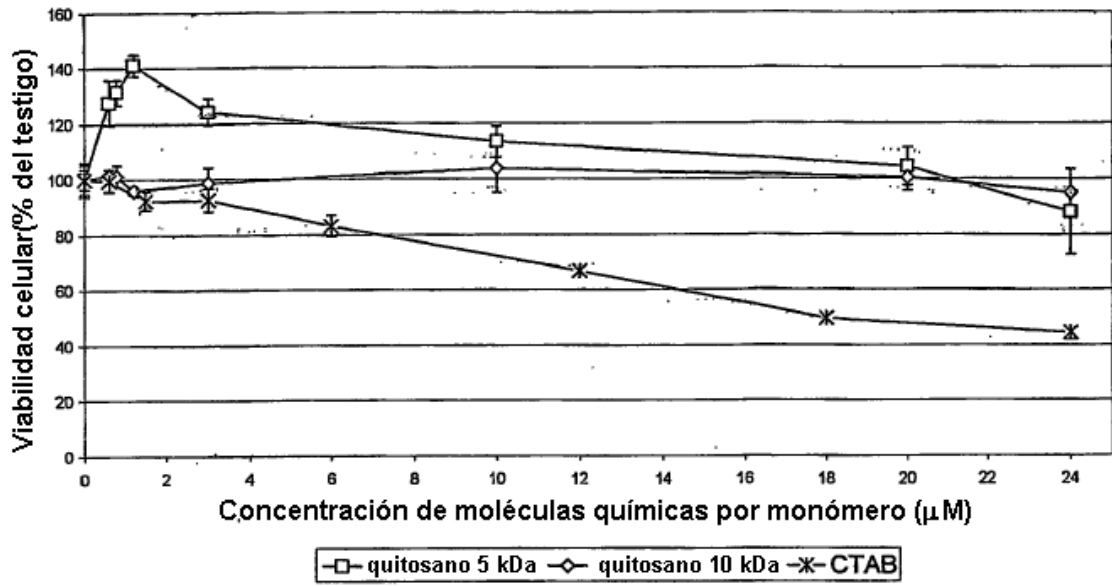


Fig. 1

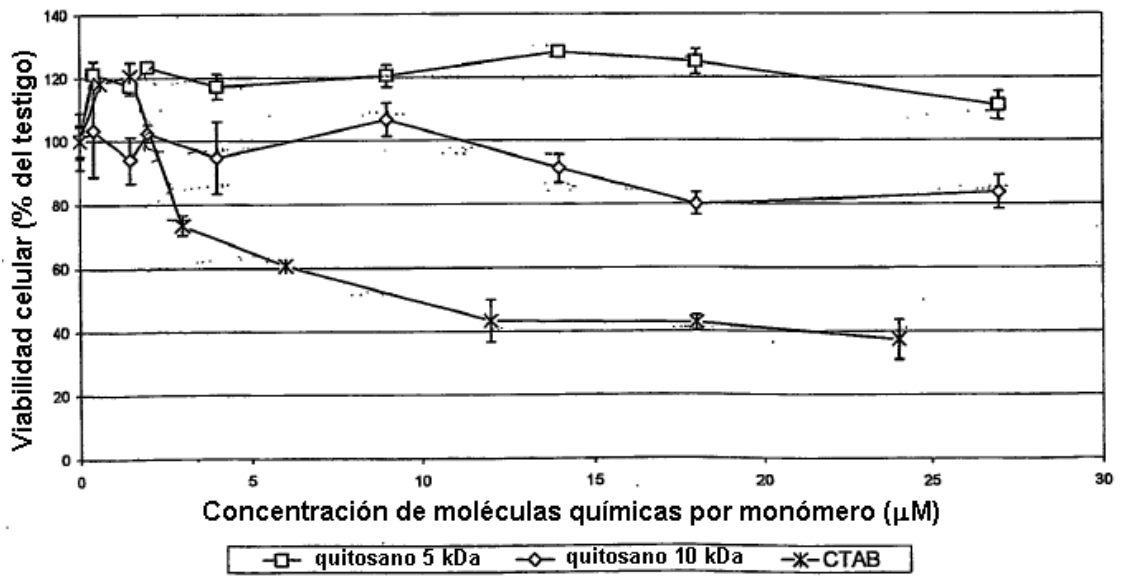


Fig. 2

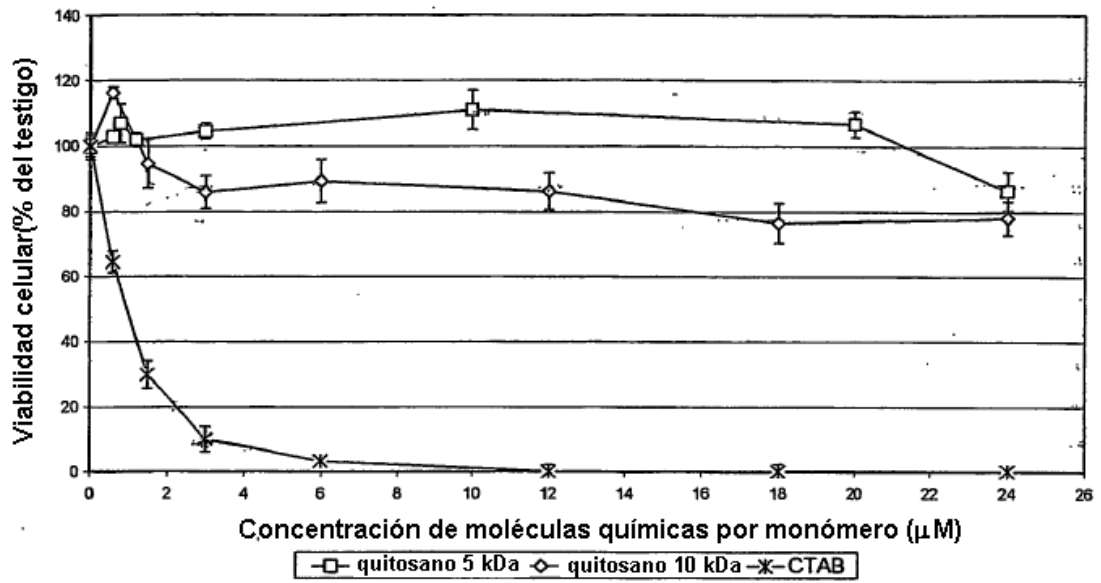


Fig.3

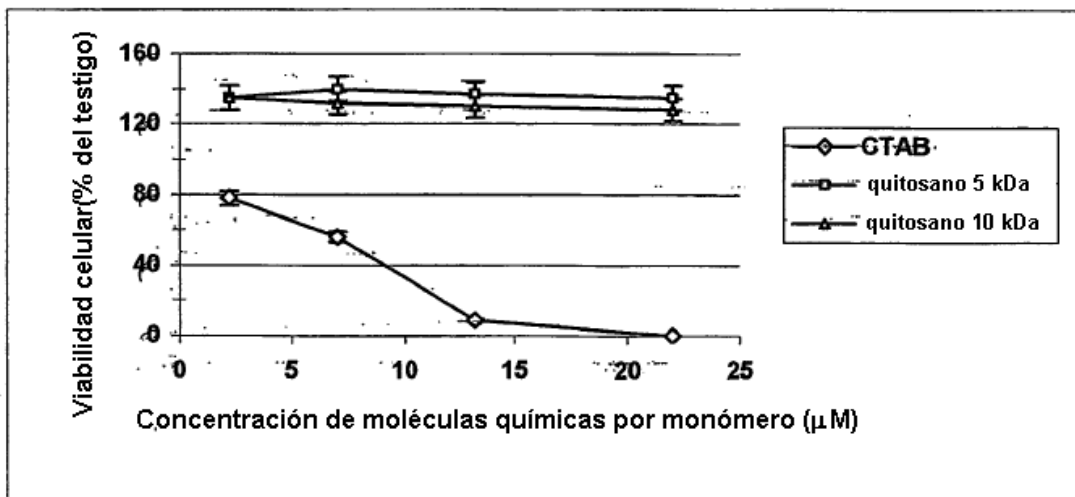


Fig. 4

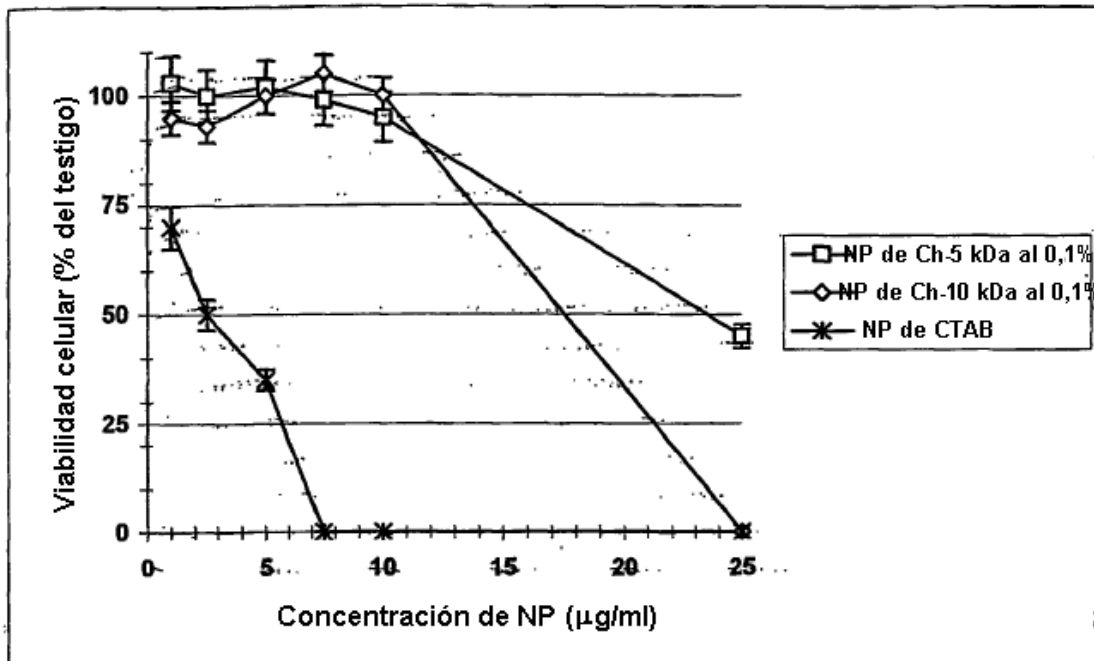


Fig. 5

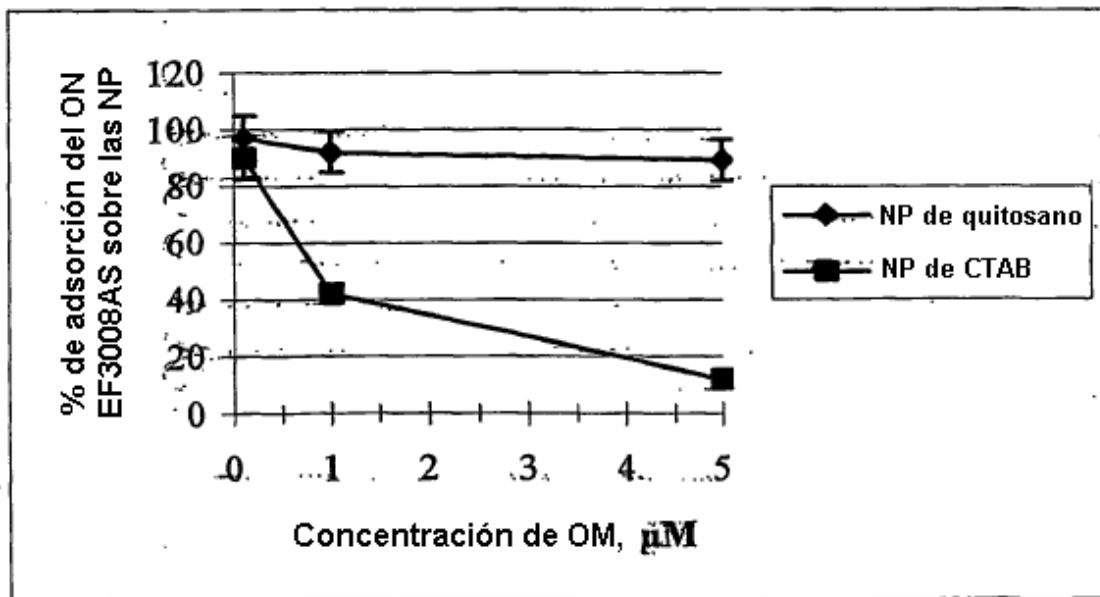


Fig. 6

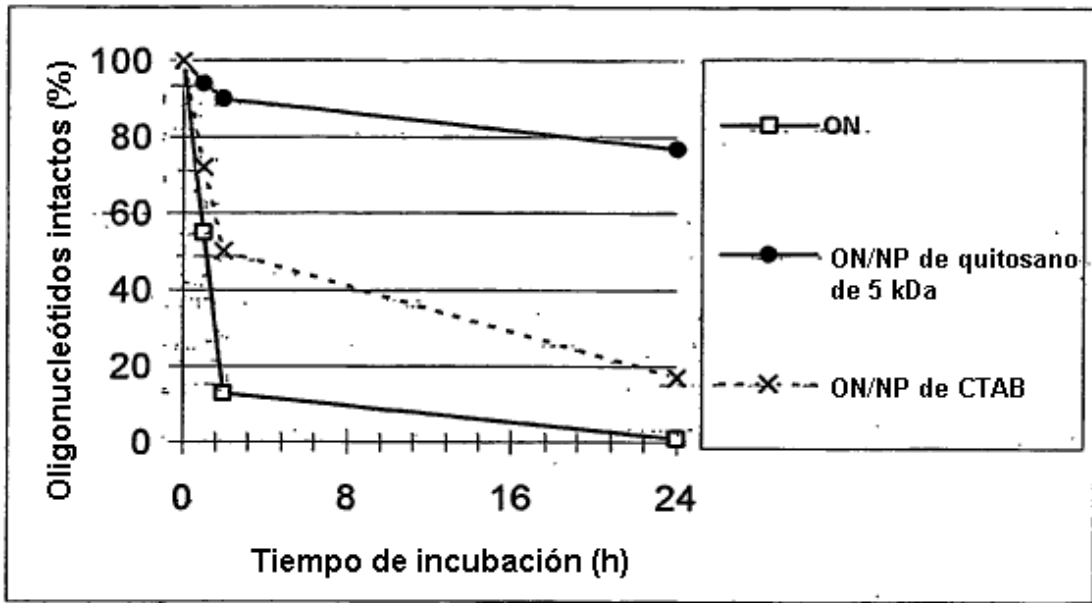


Fig. 7

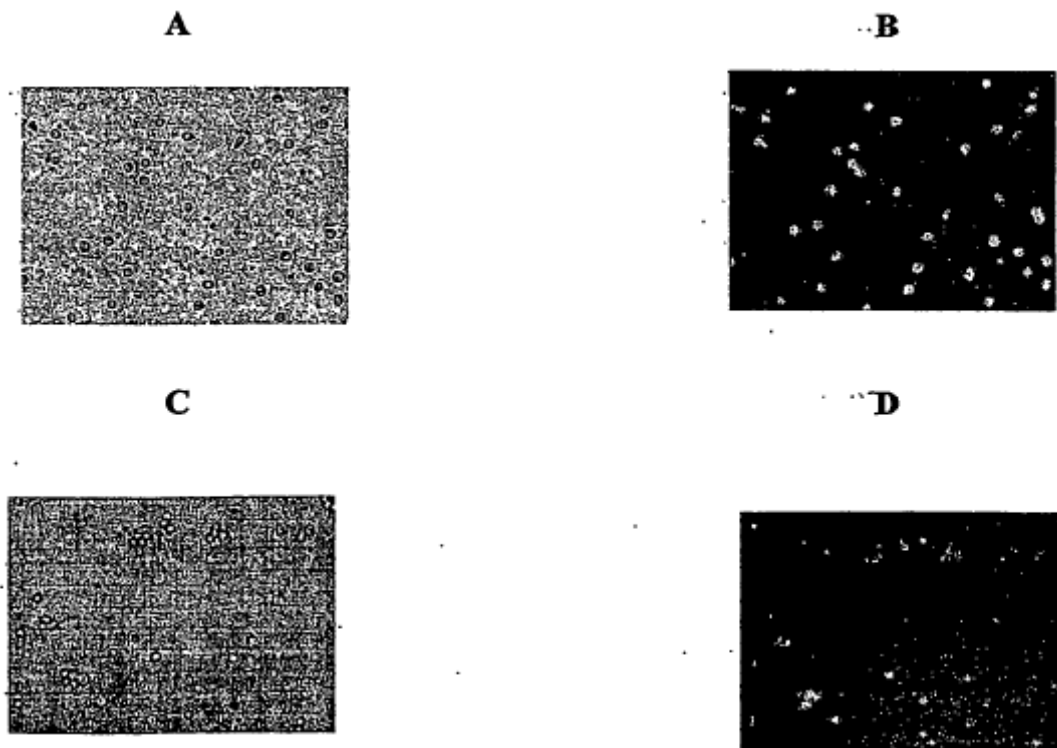


Fig. 8



Fig. 9

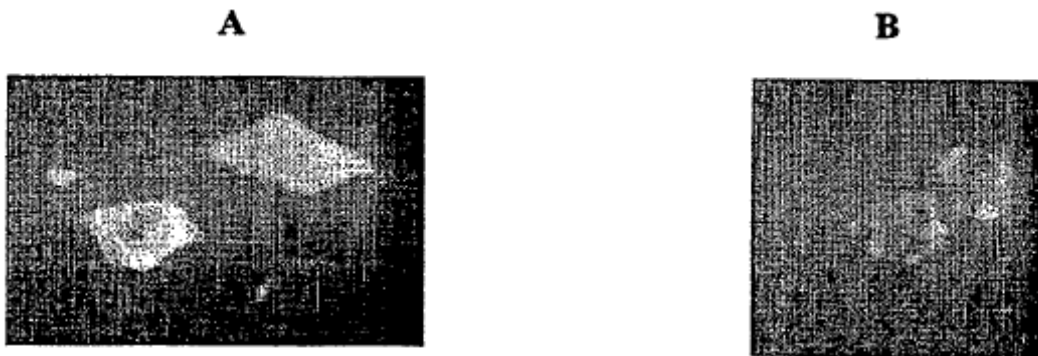


Fig. 10

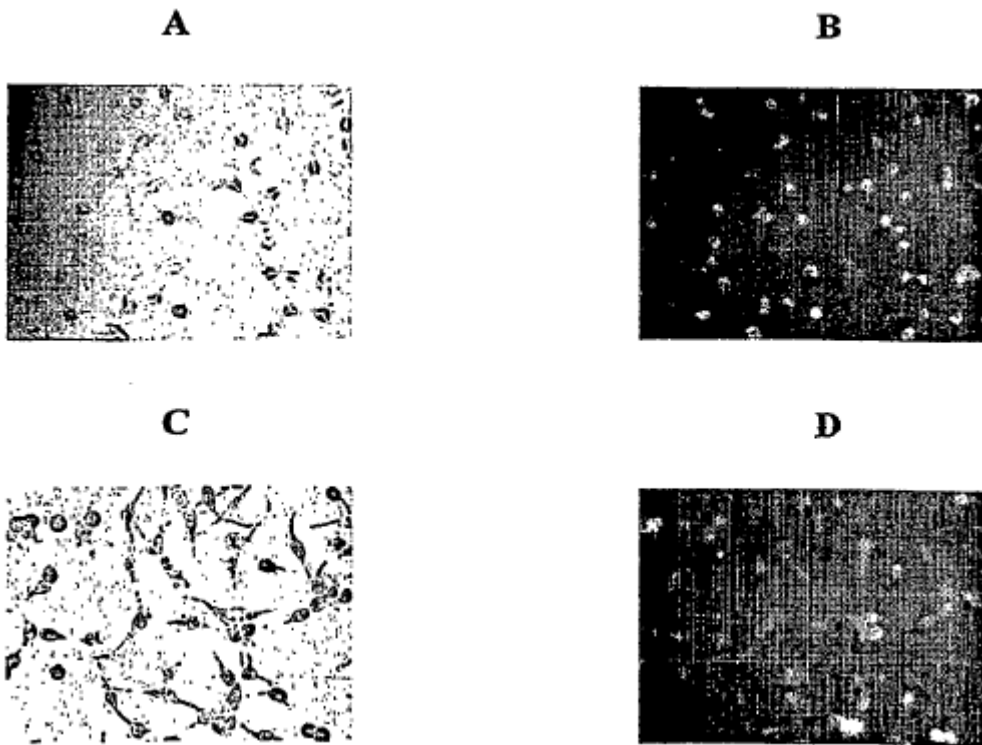
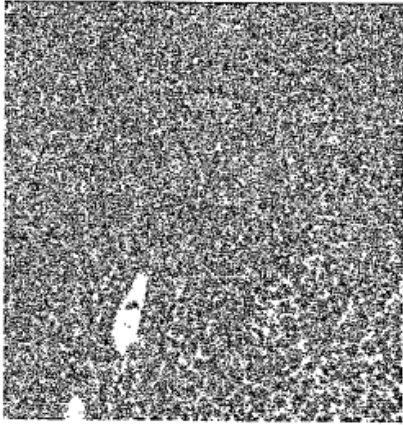


Fig. 11

A



B

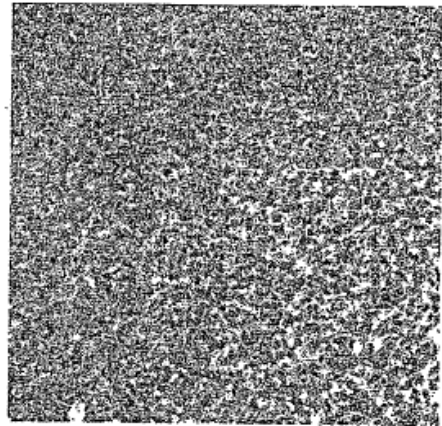
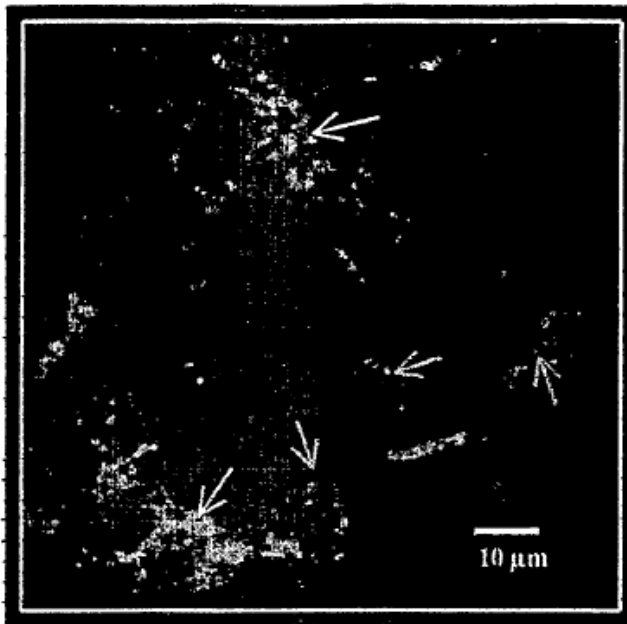
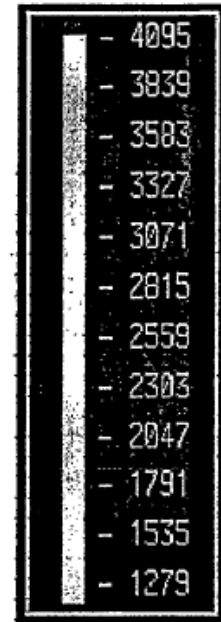


Fig. 12

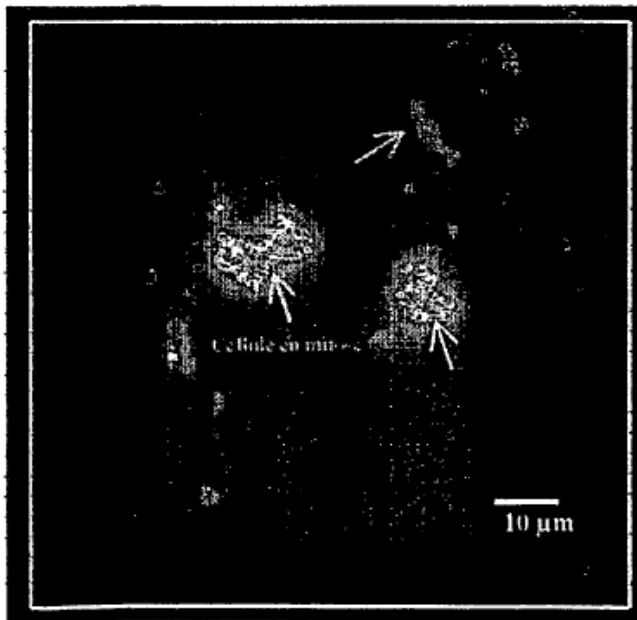
A



Valores de los colores



B



Valores de los colores

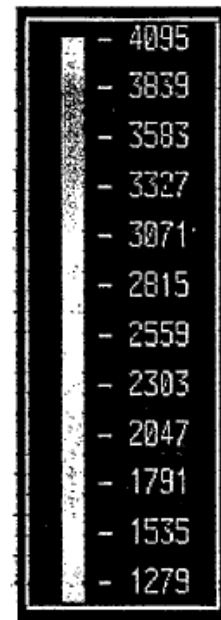


Fig. 13

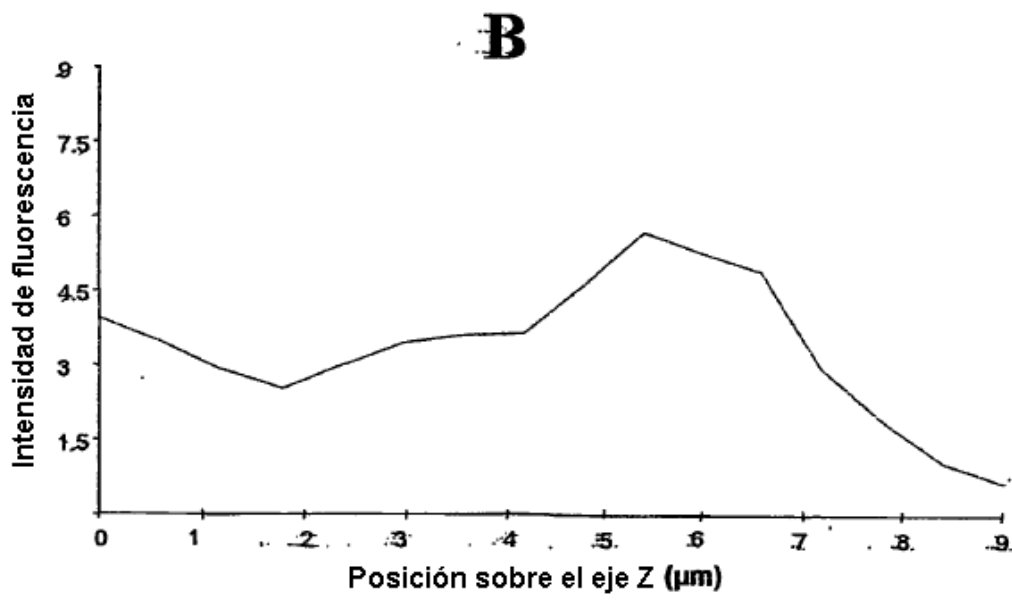
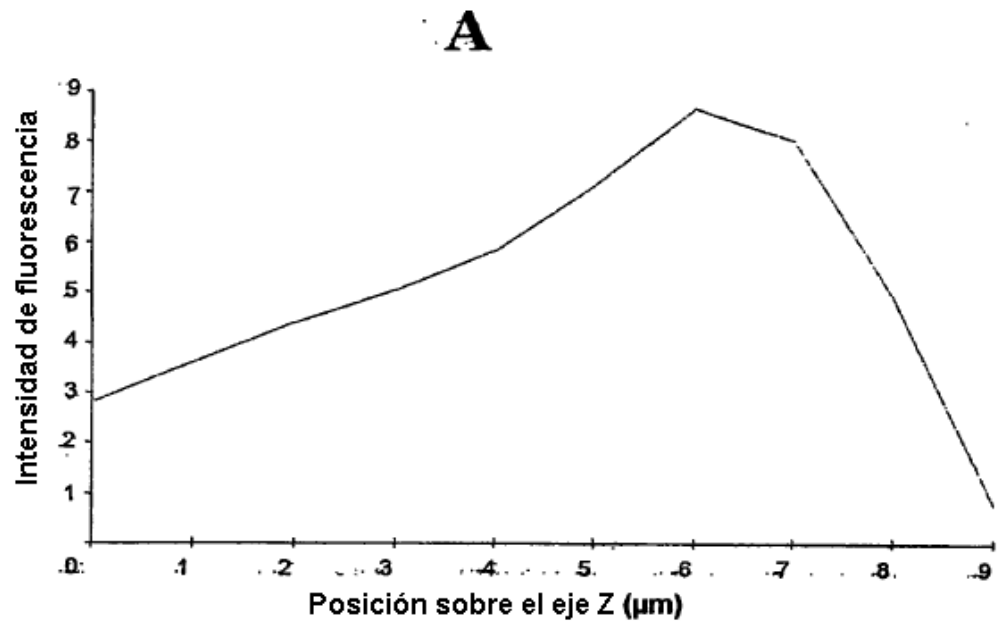


Fig. 14

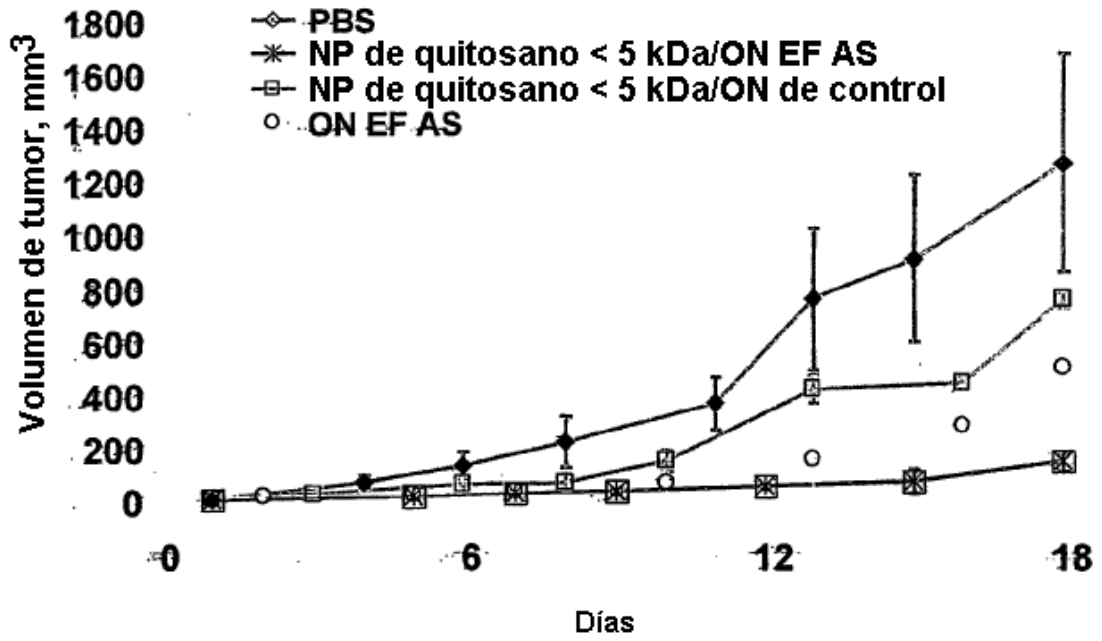


Fig. 15

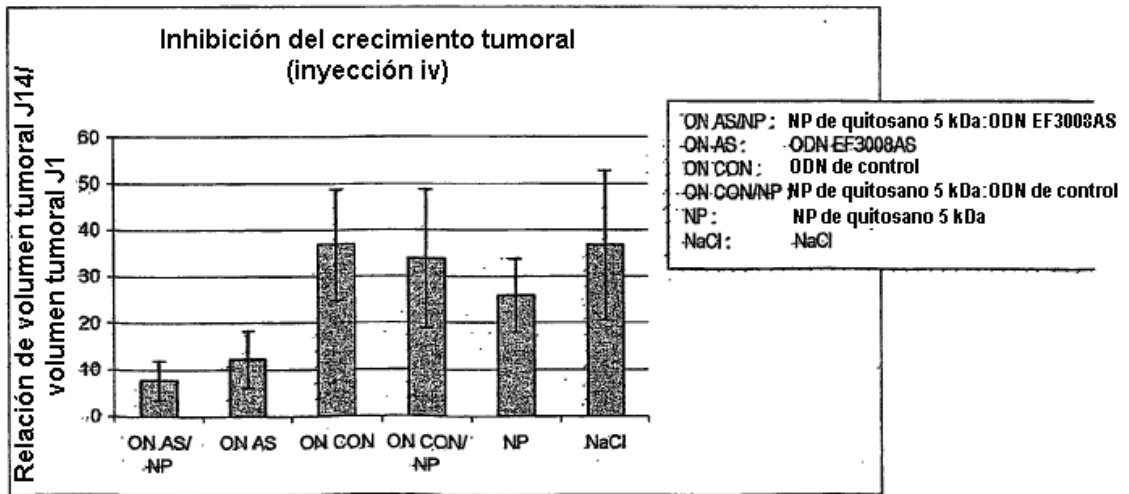


Fig. 16

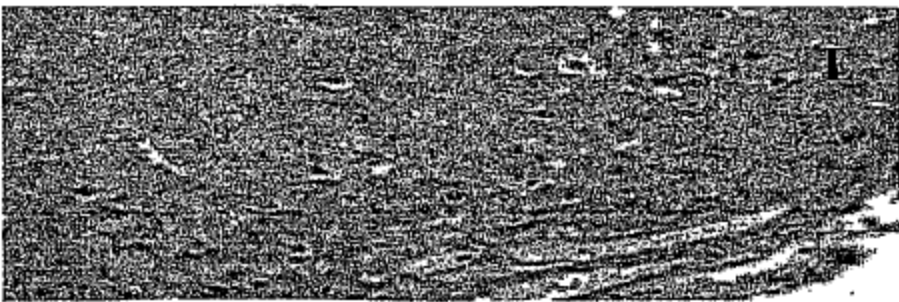
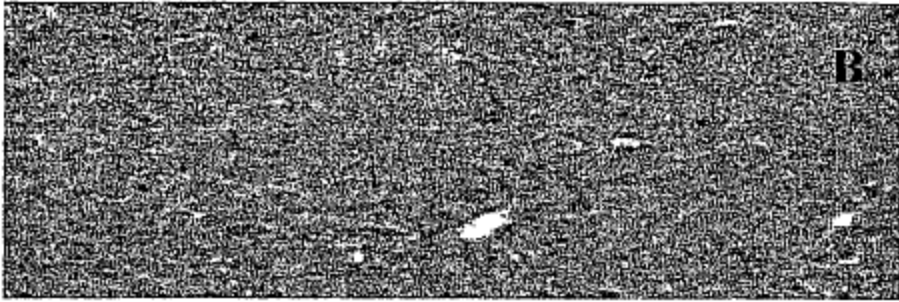
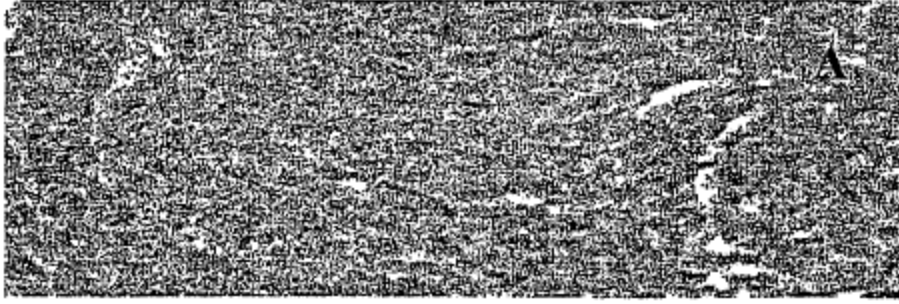


Fig. 17

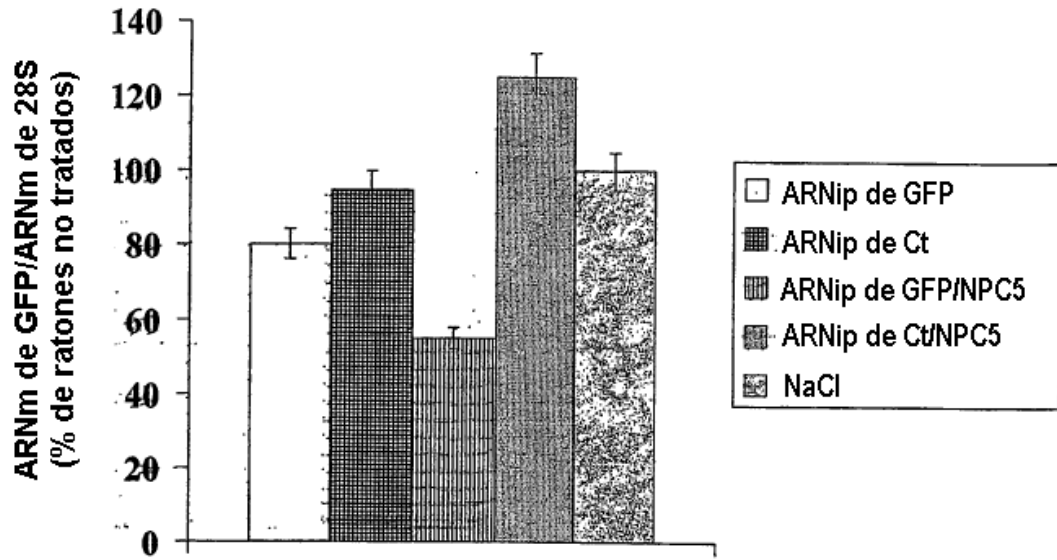


Fig. 18