

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 181**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2011 PCT/US2011/047776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12024229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2011 E 11751998 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2603450**

54 Título: **Partícula de pared celular de levadura para suministro de nanopartículas direccionadas al receptor**

30 Prioridad:

14.08.2010 US 373828 P

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

30.05.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 Franklin Street, 12th Floor
Boston, MA 02110 , US**

72 Inventor/es:

**OSTROFF, GARY, R. y
SOTO, ERNESTO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 614 181 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

Partícula de pared celular de levadura para suministro de nanopartículas direccionadas al receptor

Antecedentes de la invención

5 Los sistemas de suministro de fármaco se diseñan para suministrar un reservorio biocompatible de un agente activo para la liberación controlada del agente activo dependiente del tiempo, o de las condiciones locales, tales como el pH. Aunque los sistemas de suministro de fármaco macroscópicos tales como los parches transdérmicos, las bombas osmóticas implantables y los depósitos subcutáneos implantables (por ejemplo NOR -PLANTTM) han tenido algún éxito, estas tecnologías están a menudo limitadas en, por ejemplo, lograr dosificación controlada, compatibilidad con una variedad de biomoléculas químicamente diferentes, asociadas con la incomodidad con la administración y similares. De acuerdo con esto, ha habido un interés continuo en desarrollar sistemas de suministro de fármaco microscópico destinado a solucionar algunas de las limitaciones inherentes de los sistemas macroscópicos anteriormente descritos.

15 En particular, ha existido investigación muy reciente enfocada en desarrollar sistemas novedosos de suministro de fármaco microscópico adecuados para sustancias terapéuticas de suministro (por ejemplo, fármacos) de tal manera que se consigan beneficios óptimos, que incluyen, por ejemplo, formas de dosis de liberación controlada, formas de dosis de liberación sostenida, y similares. Una de tales aproximaciones es utilizar microencapsulación, por ejemplo, microesferas o microcápsulas, tales como portadores para fármacos. La microencapsulación es un proceso por medio del cual las sustancias terapéuticas, por ejemplo, gotas líquidas pequeñas, están rodeadas e incluidas por una caparazón intacta. La microencapsulación es una tecnología particularmente útil ya que ésta se puede utilizar para modificar, retrasar y/o dirigir el suministro del fármaco y liberarse luego de la administración. Un sistema de suministro de fármaco bien diseñado puede solucionar varios de los problemas de la terapia convencional y mejorar la eficacia terapéutica de un fármaco particular. Son los medios confiables para suministrar dosis eficaces y efectivas de fármacos los que hacen apropiado los sitios objetivo con especificidad sin efectos adversos los que han enfocado más atención a las técnicas de microencapsulación como herramientas vitales en el suministro de fármaco. Estas técnicas obtienen máxima eficacia terapéutica, en la medida en que se vuelve posible suministrar el agente al tejido objetivo en la cantidad óptima en el periodo correcto de tiempo originando de esta manera poca toxicidad y mínimos efectos colaterales.

20 La microencapsulación suministra una manera simple y efectiva en costes para incluir materiales bioactivos, tales como fármacos, dentro de un recubrimiento o membrana biocompatible con el propósito de proteger los materiales bioactivos y liberar las sustancias incluidas o sus productos de una forma controlada. Las técnicas de microencapsulación incluyen, por ejemplo, los polímeros, polisacáridos, dendrímeros, liposomas, micelas, naturales y/o biodegradables opcionalmente en formas funcionalizadas y otros de tales materiales biocompatibles.

25 Las microcápsulas y microesferas son usualmente polvos que consisten de partículas esféricas de 2 milímetros o menos de diámetro, usualmente de 500 micrómetros o menos de diámetro. Si las partículas son de menos de 1 micrómetro, ellas a menudo se denominan como nanocápsulas o nanoesferas. Una descripción de los métodos para elaborar y utilizar las microesferas y las microcápsulas se puede encontrar, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 5, 407, 609. Las microcápsulas y las microesferas se pueden distinguir la una de la otra si el agente activo se forma en el núcleo central rodeado por una estructura encapsulante, tal como una membrana polimérica, o si el agente activo se dispersa a través de la partícula; esto es, la estructura interna es una matriz del agente y excipiente, usualmente un excipiente polimérico. La liberación del agente activo de una microcápsula es a menudo regulada por la biodegradación del material de matriz, usualmente un material polimérico biodegradable tal como el poli(DL- láctido) (DL- PL) o poli(DL- láctido-co-glicólido) (DL- PLG) como el excipiente polimérico.

35 Los liposomas se pueden considerar microcápsulas en las cuales el núcleo del agente activo está comprendido por una membrana de lípido en lugar de una membrana polimérica. Los liposomas son vesículas de lípido artificiales que consisten de capas de lípido, donde el agente activo se puede encapsular dentro del compartimento acuoso del liposoma, o asociado con el liposoma sobre la superficie por vía de técnicas de acoplamiento de superficie. Los liposomas se pueden preparar fácil y poco costosamente a gran escala y bajo condiciones que sean agentes activos medios o atrapados. Ellos no inducen respuestas inmunes por sí mismos, y se utilizan en humanos para fármacos parenteralmente administrados.

40 Aunque la proporción de área/volumen de alta superficie de las microcápsulas, microesferas y liposomas favorecen la liberación del agente activo, su tamaño pequeño suministra retos en la elaboración. Una amplia variedad de métodos para preparar microcápsulas y microesferas se describe en la literatura, por ejemplo, la patente U.S. No. 5, 407. 609. Varios de estos métodos hacen uso de emulsiones para hacer microesferas, en particular para hacer microesferas menores de 2 milímetros de diámetro. Para dar un ejemplo general de tales procesos, uno puede disolver un polímero en un solvente orgánico adecuado (el solvente de polímero), disolver o dispersar un agente en esta solución de polímero, dispersar la mezcla de polímero/agente resultante en una fase acuosa (el medio de procesamiento) para obtener una emulsión de aceite en agua con micro gotas de aceite dispersadas en el medio de

procesamiento, y retirar el solvente de las microgotas para formar microesferas. Estos procesos también se pueden efectuar en emulsiones de agua en aceite y con dobles emulsiones. El uso de procesos a base de emulsión que siguen esta aproximación básica se describe en varias patentes estadounidenses, tales como, la patente estadounidense No. 3, 737, 337, 3, 891, 570, 4, 384, 975, 4, 389, 330 y 4, 652, 441.

5 Como una alternativa a los procesos de microencapsulación tradicionales, las partículas a base de levadura, o las microcapsulas de levadura, pueden servir como partículas de suministro de fármaco fácilmente disponibles, biocompatibles, biodegradables. Las microcápsulas de levadura son adecuadas para suministro de fármaco sistémico así como también el suministro de fármaco oral, tópico y de inhalación por mucosa. Las microcápsulas de levadura tienen además la capacidad de suministrar sustancias terapéuticas entre células para ayudar al suministro de fármaco.

10 El uso de microorganismos naturales preformados como microcápsulas se consideró primero en los años 70 cuando se observó que las células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), cuando se trataban con un plasmolisero, se podía utilizar encapsular sustancias solubles en agua. Cuando crece en fermentadores, las cápsulas microbianas de levadura alcanzan una distribución de tamaño uniforme y su configuración física se puede modificar al alterar simplemente el balance de nutrientes dentro del medio de fermentación. En los procesos de microencapsulación, la encapsulación puede tener lugar en células muertas así como vivas, indicando que la encapsulación tiene lugar por simple difusión. El foco inicial fue utilizar tecnología de microencapsulación basada en levadura como un medio novedoso para convertir un líquido volátil en un polvo para facilidad de manejo. Cuando se observó que las cápsulas de levadura liberaban su carga al contacto con las superficies de mucosa de la boca más fácilmente que en la saliva sola, se propuso por primera vez la posibilidad de suministro de fármacos direccionados utilizando cápsulas de células de levadura.

15 Los sistemas de suministro de fármaco de microcápsulas de levadura mejorados se describen para encapsular y suministrar una variedad de moléculas de carga soluble que incluyen, pero no están limitadas a proteínas, ácidos nucleicos, antígenos, moléculas pequeñas, y similares. Ver, en particular los documentos US 7, 740, 861, US 20050281781, US 20060083718, US 20080044438, US 20090209624, y US 20090226528. Soto y Ostroff, Bioconjug. Chem., 2008, 19(4): 840-8 divulga una tecnología de suministro de ADN basada en la síntesis capa por capa in situ de nanopartículas de ADN enjauladas dentro de partículas de pared de célula de levadura hueca (YCWP). Es además deseable, sin embargo, tener la capacidad de encapsular y suministrar cargas de partícula, tales como, nanopartículas que posibilitan a un huésped completo las nuevas funcionalidades en el campo de suministro de fármaco. En particular, las nanopartículas tienen propiedades inusuales que se pueden utilizar para mejorar el suministro de fármaco, por ejemplo, facilitar la toma celular, traficar, regular la liberación de fármaco, mejorar la solubilidad, y similares.

20 El desarrollo de los sistemas efectivos de suministro de fármaco presenta múltiples retos, tales como temas de solubilidad del fármaco, direccionamiento, estabilidad iónica y separación, y toxicidad. Los sistemas de suministro de fármaco basados en nanotecnología son una aproximación promisoría para satisfacer la necesidad de nuevo sistemas de suministro que ofrezcan varias ventajas, tales como alta capacidad de unión del fármaco debido a su gran área superficial, solubilidad y biodisponibilidad mejorada de los fármacos hidrófobos, vida media del fármaco prolongada, índice terapéutico mejorado, inmunogenicidad reducida, y la posibilidad de liberación controlada (S.S. Suri, et al., J. Occupational Med. And Toxicol. , vol. 2, pp, 1-6, 2007, R. A. Petros, et al., Nature Reviews Drug Discovery, vol. 9, pp 615- 627, 2010, E. Brewer, et al., J. Nanomaterials, vol. 2011, Article ID 408675, pp. 1-10, 2011). Las nanopartículas también se pueden sintetizar con un tamaño con control sobre el tamaño promedio, distribución de tamaño y forma de la partícula, todos factores claves relacionados con los mecanismos de toma celular y la penetración mejorada a través de barreras biológicas. Adicionalmente, algunas nanopartículas ofrecen la posibilidad del uso combinado como herramientas terapéuticas y de diagnóstico/imágenes. Un nuevo término, teranóstico, se ha propuesto recientemente para describir estos tipos de nanopartículas (D. Sun. Molecular Medicine, vol. 7, no. 6, pp. 1879, 2010). El desarrollo exitoso de los sistemas de suministro basados en nanopartículas se ejemplifica mediante el uso de nanomateriales para formulaciones de fármaco anticancerígenas (M. Ferrari, Nature Reviews, vol. 5, pp. 161- 171, 2005, M. E. Davis, et al., Nature Reviews Drug Discovery, vol. 7, pp, 771- 782, 2008).

25 Un reto primario para efectuar la promesa completa del suministro de fármaco a base de nanopartículas es la falta de estrategias óptimas para lograr el direccionamiento celular selectivo y eficiente. El mecanismo de toma NP depende del tamaño y la forma de la partícula (D. E. Owens III, et al., Int. J. Pharmacy, vol. 307. Pp. 93- 102, 2006, J. A. Champion, et al., J. Controlled Release, Vol. 121, pp. 3-9, 2007, F. Alexis et al., Molecular Pharmaceutics, vol. 5, pp. 505- 515, 2007), y varios mecanismos de toma competitivos dan como resultado procesos no deseados que incluyen la acumulación separada del objetivo en otros tejidos y células de órganos, la separación rápida de la circulación *in vivo* (especialmente nanopartículas menores de 5 nm) (S.V. Vinogradov, et al., Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 54, pp. 135- 147, 2002, H. S. Choi, et al., Nature Biotechnology, vol. 25 pp 1165-1170, 2007), la opzonización y la separación de macrófago (D. E. Owens III, et al., Int J. Pharmacy, vol. 307, pp. 93- 102, 2006, J. A. Champion et al., J. Controlled Release, vol. 121, pp. 3- 9, 2007, F. Alexis, et al., Molecular Pharmaceutics, vol. 5, pp. 505- 515, 2007, S. V. Vinogradov, et al., Advanced Drug Delivery Reviews vol. 54, pp. 135- 147, 2002, H. S. Choi, et al., Nature Biotechnology, vol. 25, pp. 1165- 1170, 2007, M. D. Howard, et al., J. Biomedical Nanotechnology, vol.

4, pp. 133-148, 2008), y la activación complementaria por proteínas que dan como resultado reacciones de hipersensibilidad (I. Hamad, et al., *Molecular Immunology*, vol. 45, pp. 3797- 3803, 2008). Las nanopartículas pueden ser direccionadas de algún modo uniendo ligandos con especificidad a los receptores que se sobreexpresan en ciertas células (es decir, los receptores de folato y transferrina en células cancerígenas (Wang, et al., *ACSNano*, vol. 3, pp. 3165- 3174, 2009, P. S. Lowet al., *Accounts of Chemical Research*, vol. 41, pp. 120- 129, 2008, C. H. J. Choi, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 107, pp. 1235- 1240, 2010, M. B. Dowling et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 21, pp. 1968- 1977, 2010, L. Han. Et al., *Molecular Pharmaceutics*, vol. 7, no. 6, pp. 2156- 2165, 2010), o direccionando las poblaciones de células con alta selectividad mediante injertos de unidades estructurales de direccionamiento específico a receptores superficiales de célula conocidos por ser expresados solamente sobre células objetivo, (es decir anticuerpos para dirigir a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) (A. K. Patri et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 15, pp. 1174- 1181, 2004) o galactosa a células receptoras de asialoglicoproteína objetivo sobre células de hepatocito (C. Plank. Et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 3, pp. 533- 539, 1992). Algunos procesos de interferencia se pueden reducir al recubrir las nanopartículas con un polímero hidrofílico (es decir una brocha de polímero PEG o nanopartículas Stealth). El PEG es un polímero resistente no inmunogénico, no tóxico y resistente a la unión de proteína. El recubrimiento del PEG de las nanopartículas evita la opsonización al blindar cargas de superficie, reducir la separación de macrófago, incrementar la repulsión estérica de los componentes de la sangre, e incrementar la hidrofiliidad y la circulación de nanopartículas *in vivo* (M. D. Howard, et al., *J. Biomedical nanotechnology*, vol. 4, pp. 133- 148, 2008, K. G. Neoh, et al., *Polymer Chemistry* vol 2. Pp. 747- 759, 2011). Dado el reciente enfoque en los sistemas de suministro a base de nanopartículas, por ejemplo, en metodologías de suministro de fármaco, subsiste la necesidad de sistemas mejorados capaces de mejorar el suministro, en particular, configuraciones terapéuticas.

Resumen de la invención

La presente invención se define en y mediante las reivindicaciones finales. La presente invención mejora las metodologías de microencapsulación basadas en levadura previamente descritas, en particular, al suministrar para la incorporación de nanopartículas en y/o sobre partículas de pared celular de levadura (YCWP), por ejemplo, partículas glucano de levadura (micropartículas) (YGP). Las tecnologías mejoradas provén el suministro de partículas, las nanopartículas mismas tienen utilidad en aplicaciones biomédicas, o las nanopartículas que imparten una o más funcionalidades de uso en varias aplicaciones biomédicas, por ejemplo aplicaciones de suministro de fármaco.

En un aspecto, la invención suministra un método para elaborar una partícula de pared celular de levadura (YCWP), por ejemplo, partícula de glucano de levadura (YGP), sistema de suministro, que comprende partículas de pared de célula de levadura (YCWP), por ejemplo, las (YGP), que comprenden nanopartículas que tienen al menos una dimensión de aproximadamente 1-40 nm (por ejemplo, aproximadamente 1-40, 2-40, 5-30, 10-30, 10-40, o 20-40 nm) dentro del interior de las YCWP, en donde el sistema de suministro YCWP se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de:

a) cargar las YCWP, por ejemplo, las YGP, con las nanopartículas al incubarlas juntas en suspensión, por ejemplo, durante aproximadamente 1-2 horas,

b) secar, por ejemplo, liofilizar, el material resultante de (a),

c) opcionalmente repetir la carga y secar, por ejemplo, liofilizar, etapas de al menos una vez,

d) suspender las YCWP, por ejemplo, las YGP, y las nanopartículas en solución, por ejemplo, agua, durante un tiempo suficiente para promover la entrada adicional de nanopartículas en las YCWP, por ejemplo, "empujar" las nanopartículas en las YCWP,

e) opcionalmente secar el material resultante de (d), y opcionalmente (f) atrapar las nanopartículas en las YCWP, por ejemplo, las YGP, utilizar unos medios de atrapado apropiados,

de tal manera que se prepara el sistema de suministro YCWP.

El secado se puede lograr, por ejemplo, mediante evaporación, secado al vacío. Liofilización, calor medio, secado con aire, secado con gas, secado por congelamiento y cualesquier otros medios adecuados para remover reactivos líquidos (por ejemplo amortiguador o solvente) de suspensiones.

En otro aspecto, la invención suministra, una partícula de pared celular de levadura (YCWP), por ejemplo, un sistema de suministro de partícula de glucano de levadura (YGP) y un método para elaborar un sistema de suministro YCWP, que comprende partículas de pared celular de levadura (las YCWP), por ejemplo las YGP, que comprenden nanopartículas que tienen al menos una dimensión de aproximadamente 10-1000 (por ejemplo, aproximadamente 10-100, 100-500, 500-1000, preferiblemente 30 nm o mayor, por ejemplo, 30-1000 nm), sobre la

superficie de las YCWP, en donde el sistema de suministro YCWP se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de:

a) obtener las YCWP, en donde la superficie de la YCWP (por ejemplo las YGP) se derivan y/o modifican para facilitar la carga de nanopartícula (NP) sobre la superficie,

5 b) incubar las YCWP de la etapa (a) con nanopartículas (NP) juntas en suspensión durante un tiempo suficiente para facilitar la carga de los NP sobre la superficie de las YCWP, por ejemplo, aproximadamente 12-24 horas, y

c) lavar y/o dispersar, por ejemplo, sonicar, el material resultante de (b),

de tal manera que se prepara el sistema de suministro YCWP.

10 En las realizaciones de ejemplo, las YCWP (por ejemplo las YGP) son derivados de superficie por ejemplo, derivados para tener una superficie electrostática, por ejemplo, una superficie catiónica o aniónica y los NP están unidos, por ejemplo, electroestáticamente unidos a la superficie derivada. En otras realizaciones de ejemplo, las YCWP (por ejemplo YGP) son modificados en superficie, por ejemplo, modificados para facilitar la unión covalente o afinidad de los NP a la superficie. En una realización, las YCWP (por ejemplo las YGP), son modificados en superficie para facilitar la unión de biotina – streptavidina de los NP a la superficie. En otra realización, las YCWP (por ejemplo las YGP) son modificados en superficie para facilitar la unión covalente de los NP a la superficie. En realizaciones de ejemplo, las YCWP (por ejemplo las YGP) son derivados en superficie modificados en superficie para facilitar la unión de los NP a la superficie. (Por ejemplo, unidos electrostáticamente y/o conjugados por afinidad) a la superficie.)

20 Cada uno de los métodos de ejemplo anteriores se pueden utilizar para cargar una variedad de nanopartículas en o sobre las YCWP (por ejemplo las YGP). En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden ser puntos cuánticos. En otras realizaciones, las nanopartículas pueden ser partículas magnéticas. En otras realizaciones, las nanopartículas pueden ser virus o partículas similares a virus, por ejemplo, para aplicaciones de suministro de gen. En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden ser nanopartículas de sílice, por ejemplo, nanopartículas de sílice mesoporoso (MSN). En algunas realizaciones, las nanopartículas incluyen una carga. En algunas realizaciones, las YCWP (por ejemplo las YGP) incluyen nanopartículas y una o más cargas. En algunas realizaciones, las YCWP (por ejemplo las YGP) incluyen nanopartículas y/o cargas marcadas.

25 En ciertas realizaciones, los medios de atrapamiento pueden ser medios de atrapamiento electrostático. En varias realizaciones, el atrapamiento electrostático puede resultar de la interacción de la nanopartícula con una molécula que atrapa polimérico catiónico, por ejemplo, PEI.

30 En algunas realizaciones, los medios de atrapamiento pueden ser a través de unos medios de atrapamiento físico. En ciertas realizaciones, el atrapamiento físico puede resultar de la interacción de la nanopartícula con una molécula de atrapamiento seleccionada del grupo que consiste de tARN alginato, y quitosano. Otras moléculas de atrapamiento adecuadas se describen en detalle adelante.

35 En algunas realizaciones, los medios de atrapamiento pueden ser medios de atrapamiento hidrófobo. En otras realizaciones, los medios de atrapamiento pueden ser medios de atrapamiento de afinidad. En aún otras realizaciones, los medios de atrapamiento toman ventaja de más de un tipo de propiedad de interacción, por ejemplo, medios de atrapamiento que tienen tanto propiedades electrostáticas como de afinidad.

40 En algunas realizaciones, más de una partícula puede ser cargada en, sobre, o dentro de una YCWP (por ejemplo YGP) de la invención. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas se pueden cargar en una partícula y sobre la superficie de una partícula, por ejemplo, por vía de una biotina: medios de streptavidina. En otras realizaciones, las nanopartículas (una o más) se pueden cargar con cargas solubles (una o más, opcionalmente poliplexadas). Los formatos multicapa están fácilmente dentro del alcance de la invención. Las moléculas de carga soluble también se pueden unir, o incrustar en las nanopartículas de la invención. Sin estar ligados a la teoría, se cree que las propiedades de autoagregación de las nanopartículas pueden, en algunos casos, ser benéficas para atrapar las nanopartículas dentro de los YCWP (por ejemplo YGP).

45 La descripción anterior describe ampliamente las características y las ventajas técnicas de ciertas realizaciones de la presente invención. Las ventajas técnicas adicionales se describirán en la descripción detallada de la invención que sigue. Las características novedosas que se cree que son características de la invención será mejor entendidas de la descripción detallada de la invención cuando se considera en relación con las figuras y ejemplos que la acompañan. Sin embargo, las figuras y los ejemplos suministrados aquí pretenden ayudar a ilustrar la invención para ayudar a desarrollar un entendimiento de la invención, y no pretenden ser definiciones en el alcance de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 describe esquemáticamente estrategias de carga de nanopartícula de ejemplo (NP) dentro o sobre la superficie de la partículas de glucano (GP).
- La Figura 2 describe gráficamente la caracterización mediante el potencial Zeta de las nanopartículas magnéticas aniónicas con y sin PEI. La Figura 2B muestra la caracterización mediante el potencial Zeta de formulaciones GP vacías.
- La Figura 3 grafica la caracterización de las formulaciones GP magnéticas mediante potencial Zeta. La Figura 3A describe caracterización mediante potencial Zeta de nanopartículas magnéticas aniónicas + formulaciones GP con PEI (muestra GP magnética limpia). La Figura 3B describe gráficamente la caracterización mediante el potencial Zeta de nanopartículas magnéticas aniónicas + formulaciones GP con PEI contaminado con nanopartículas libres (la muestra GP magnética con nanopartículas libres).
- La Figura 4 describe gráficamente % del siARN unido a las GP cargados con diferentes nanopartículas magnéticas (unión de nanopartícula magnética GP/ PEI siARN)
- La Figura 5 es una gráfica que describe el % del siARN unido a las GP cargados con tARN- PEI vs. AU-MUA vs. Au-MUA-PEI (unión GP-Au/MUA/PEI siARN)
- La Figura 6 describe gráficamente unión de nanopartículas a la superficie GP. La Figura 6A describe un esquema de ejemplo que describe el acoplamiento covalente de polímeros catiónicos a GP por vía de aminación reductiva. La Figura 6B describe un esquema de ejemplo que describe la unión no covalente de nanopartículas de poliestireno carboxiladas de rodamina a las GP.
- La Figura 7A Describe gráficamente la eficiencia de unión de las GP derivados con diferentes pesos moleculares de PEI para nanopartículas de poliestireno fluorescentes aniónicas de 20, 100, y 200 nm de diámetro (los resultados experimentales fueron obtenidos en una proporción cPS-NP/GP) de 100: 1, los valores corresponden al promedio de al menos cinco muestras. La Figura 7B describe la estabilidad de los cPS-NP/GP. Los cPS-NP liberados de las muestras de PEI-GP luego de incubación en PBS + 10% FBS (pH 7) o amortiguador de acetato 0.1 M + 10% FBS (pH 5).
- La Figura 8A describe imágenes microscópicas de las GP que contienen 20 nm de nanopartículas de poliestireno de carboxilato fluorescente aniónico. La Figura 8B describe fotomicrografías fluorescentes que muestran la toma de GP-cPS-NP al controlar las células de fibroblasto NIH3T3 (izquierda) y células NIH3T3-D competentes en fagocitosis de GP.
- La Figura 9 describe la caracterización de las formulaciones GP mediante el Potencial Zeta. La Figura 9A describe el potencial Zeta de los NP de poliestireno aniónico de 200 nm solos. La Figura 9B describe el potencial Zeta de la partícula de glucano (GP) control + cPS-NP. La Figura 9C describe el potencial Zeta de los PEI-GP + cPS-NP de 25 k.
- La Figura 10 describe los cPS-NP y la toma en las células como se demostró microscópicamente y por vía de análisis FACS.
- La Figura 11 describe la eficiencia de unión de la unión Dox-MSN a PEI-GP de 25 k (los resultados son el promedio de las tres muestras)
- La Figura 12 describe el potencial Zeta que monitoriza la unión de Dox-MSN a (a) GP y (b) PEI-GP de 25 k. Inserción; imágenes microscópicas fluorescentes de la unión Dox-MSN a GP (a) y PEI-GP de 25 k (b). Las muestras fueron preparadas con Dox-MSN/GP 25 fg (~ 0.9 pg Dox-GP)
- La Figura 13 describe el suministro Dox mediado por GP eficiente en NIH 3T3-D (las fotografías fueron tomadas con una ampliación 40x)
- La Figura 14 describe la detención del crecimiento de las células NIH 3T3-D1 con formulaciones Dox (los resultados experimentales son el promedio de cuatro muestras).
- La Figura 15 describe el % de las células 3T3 o 3T3-D1 (en las cuales se incorporó fGP-mag-NPs) purificado mediante unión a una columna magnética.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un sistema de suministro de nano partícula que caracteriza las partículas de la pared celular de levadura (YCWP), por ejemplo, las partículas de glucano de levadura (YGP) (también denominadas, aquí partículas de glucol (GP)), que incorporan nanopartículas preformadas insolubles (NPs) de, por ejemplo, menos de aproximadamente 30 nm de diámetro como núcleos dentro de las YCWPs, por ejemplo, partículas de glucano (NP) o nanopartículas electroestáticamente unidas a la superficie de las YCWP derivados, por ejemplo, partículas de glucano (NP-GP) (Figura 1). Las ventajas de la nano partícula YCWP, por ejemplo, YGP nanopartícula, la encapsulación incluye: (1) la encapsulación de los complejos de carga que no puede ser preparados *in situ* como las condiciones sintéticas no son compatibles con las YCWP, por ejemplo, las partículas de glucano de levadura (2) la carga de nanopartículas que pueden mejorar la capacidad para cargar las moléculas pequeñas de fármaco (fármacos hidrófobos neutros) en las YCWP, por ejemplo, las YGP y (3) la incorporación de las nanopartículas con una propiedad intrínseca, tales como nanopartículas magnéticas, creando así la versatilidad de las partículas, ya que la misma formulación se podría utilizar para el suministro del fármaco y las propiedades magnéticas empleadas para la purificación de célula, o aplicaciones de imágenes (E. Soto, et al., V. Vetvicka y M. Novak (Eds) Bentham Press, 82 pp., 2011).

El desarrollo de la nanopartícula YCWP, por ejemplo, la nanopartícula YGP las formulaciones cargadas utilizaron dos tipos de modelos de nanopartículas: (1) las nanopartículas de poliestireno fluorescentes de distribución de tamaño estrecho para permitir la visualización y caracterización mediante técnicas fluorescentes, y (2) las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) para la encapsulación del fármaco quimioterapéutico, doxorubicina para evaluar la actividad biológica. Los MSN son partículas altamente porosas preparadas de tetraetil ortosilicato polimerizado sobre una plantilla tal como una micela tensoactiva (C.T Kresge, et al., Nature, vol.359, pp. 710-712, 1992, B. G. Trewyn, et al., Account of Chemical Nature, vol. 40, no. 9, pp. 846-853, 2007). Desde el descubrimiento de los MSN en 1992, se ha hecho investigación para evaluar estos materiales para la absorción, catálisis, dispositivos químicos y más recientemente agente de suministro de fármaco (es decir, el suministro de los fármacos para cáncer camptotecina, paclitaxel, doxorubicina (E.R Gillies, et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 16, pp. 361-368, 2005, J. Lu, et al., Small, vol. 3, no. 8, pp 1341-1346, 2007, J. Lu, et al., Nanobiotechnology, vol. 3, pp. 89-95, 2007)). Los MSN fueron seleccionados como una nanopartícula modelo en razón de facilidad de síntesis, capacidad de unión para moléculas de fármaco pequeñas, y la posibilidad de extender las capacidades de las YCWP direccionadas, por ejemplo, los PG direccionados, el suministro de fármacos hidrofóbico. El suministro de doxorubicina (Dox) estudia aquí como una primera etapa en el desarrollo del suministro direccionado de macrófago YCWP/YGP en quimioterapia. Los macrófagos son conocidos por migrar a tumores sólidos y se cree que ellos actúan como "caballos de Troya" que llevan las dosis letales de los Dox-GP hacia los tumores para que el suministro direccionado para el fármaco de cáncer divida rápidamente las células tumorales.

Las partículas de glucano de levadura (YGP) (también denominadas aquí como partículas de glucano (GP) se caracterizan por uso en varios de los sistemas de suministro de nanopartícula ejemplificados aquí, aunque el experto apreciara que otros YCWP pueden ser rápidamente adaptados para uso en los sistemas de suministro de nanopartícula de la invención. Las partículas de glucano de levadura (YGP) o partículas de glucano (GP), son microesferas porosas, huecas que se preparan de *Saccharomyce cerevisiae* (levadura de Baker). Las microesferas de glucano tienen un diámetro promedio de 2-4 micrómetros y están compuestas de 1,3-D glucano y cantidades en traza de quitina. El polisacárido 1,3-D-glucano sobre la superficie GP sirve como un ligando para la toma celular mediada por receptor mediante las células fagocíticas que llevan los receptores de β -glucano (receptor dectin-1(D1) y el receptor 3 de complemento (CR3)) (G.D. Brown et al., vol. 413, pp. 36-37,2001), tales como los macrófagos y las células dendríticas en el sistema inmune. La toma de GP ha demostrado ser dependiente de la dectina-1 *in vitro* (H. Huang, et al., *Infection and Immunity*, vol. 77, pp. 1774-1781,2009). La capacidad para direccionar selectivamente a las células fagocíticas hace de la partícula de glucano un vehículo de suministro de fármaco atractivo para esta población celular. Las propiedades del material hueco y poroso de las GP permiten la encapsulación, transporte, suministro y liberación de las cargas electroestáticamente unidas. Previamente, se han descrito las GP para el suministro de macrófagos direccionados de una variedad de macromoléculas de carga soluble (por ejemplo, proteínas (H. Huang, et al., *Infection and Immunity*, vol. 77, pp. 1774-1781, 2009), ADN (E. Soto, et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 19, no. 4, pp. 840-848, 2008) y siARN (M. Aouadi, et al, *Nature*, vol. 458, pp 1180-1184,2009, G. Tesz, et al., *Biochemical Journal*, vol. 436, pp. 351-362,2011)), y moléculas de fármaco pequeñas, tales como el antibiótico Rifampicin (E. Soto, et al., *Polymers*, vol. 2 436, pp. 681-689,2010). Sin embargo, el uso de las GP para el suministro de moléculas pequeñas de fármaco se limita ya que la mayoría de las moléculas pequeñas de fármaco son neutras, monovalente se encarga, o insolubles en agua y tales cargas no son fácilmente atrapadas dentro de las partículas de glucano que utilizan un núcleo de políplex o los métodos de encapsulación capa por capa (LbL) desarrollados para los ácidos nucleicos y las proteínas.

La presente invención mejora luego de las metodologías de micro encapsulación basadas en levaduras previamente descritas, en particular, al suministrar la incorporación en nanopartículas en y/o sobre las partículas de pared de célula de levadura (YCPW), por ejemplo, las partículas de glucano de levadura (micropartículas) (YGP). Las tecnologías mejoradas proporcionan el suministro de nanopartículas, las nanopartículas mismas tienen utilidad en aplicaciones biomédicas, o las nanopartículas que imparten una o más funcionalidades de uso en varias aplicaciones biomédicas, por ejemplo aplicaciones de suministro de fármaco. La presente invención se relaciona generalmente con cargar partículas de pared celular de levadura YCWP (por ejemplo (YCP)) con nanopartículas

para el suministro de fármacos direccionados al receptor. En particular, la presente invención se relaciona con nanopartículas de carga sobre la superficie o dentro del caparazón de una YCWP (por ejemplo el caparazón de glucano de una partícula de glucano de levadura (YGP)). La presente invención se relaciona además con métodos para elaborar una YCWP, por ejemplo, una YGP o un GP, cargado con nanopartículas. La presente invención también se relaciona con métodos para utilizar las YCWP, por ejemplo, el uso de las YGP o GP cargados con nanopartículas para el suministro direccionado al receptor de las nanopartículas.

En realizaciones de ejemplo de la invención, las YCWP, por ejemplo las YGP o las GP, están cargados con una molécula de carga, o con una nanopartícula que tiene una funcionalidad compatible con una molécula de carga. En otras realizaciones de ejemplo, las YCWP, por ejemplo, YGP o las GP, están cargados con una nanopartícula que tiene una funcionalidad deseada. En ciertas realizaciones de ejemplo, las YCWP, por ejemplo, las YGP o las GP pueden además incluir una molécula de atrapamiento para atrapar una molécula de carga y/o una nanopartícula. En algunas realizaciones de ejemplo, las YCWP, por ejemplo, las YGP o las GP tienen moléculas de carga y/o nanopartículas cargadas en el interior de las YCWP. En otras realizaciones de ejemplo, las YCWP, por ejemplo, las YGP o las GP tienen moléculas de carga cargadas al interior de las YCWP.

Antes de describir la invención, puede ser de ayuda entender el entendimiento de estas para establecer las definiciones de ciertos términos a ser utilizados en lo sucesivo.

Como se utiliza aquí, el término "micropartículas" se refiere a un sistema de partícula o constituido por partículas pequeñas, generalmente mayores de aproximadamente (1 μ m) de diámetro y se puede utilizar para describir tanto las micro cláusulas como las microesferas. Las micropartículas se pueden emplear en una variedad de tecnologías de suministro de fármaco y se pueden emplear para varios propósitos que incluyen, pero no se limitan a, suministro de fármaco controlado, protección de fármacos de la degradación, y protección del cuerpo de los efectos tóxicos de los fármacos.

Como se utiliza aquí, el término "nanopartículas" se refiere a una partícula que tiene cualquier característica estructura en una escala menor de aproximadamente 10000 nm que exhiba propiedades novedosas comparadas con una muestra en bruto del mismo material. De manera rutinaria, las nanopartículas tienen cualquier característica estructural en una escala de menos de aproximadamente 100 nm. En realizaciones de ejemplo, una nanopartícula es una partícula que tiene una o más dimensiones del orden de aproximadamente 1-1000 nm. En otras realizaciones de ejemplo, una nanopartícula es una partícula que tiene una o más dimensiones del orden de aproximadamente 1-1000. Una nanopartícula esférica tendría un diámetro, por ejemplo, de entre aproximadamente 1-100 o 1-1000 nanómetros.

Una nanopartícula más a menudo se comporta como una unidad en términos de su transporte y propiedades. Se debe notar que las propiedades novedosas que diferencian las nanopartículas del correspondiente material en bruto típicamente desarrollan una escala de tamaño menor de 1000 nm o de un tamaño inferior a 100 nm, pero las nanopartículas pueden ser de tamaño mayor, por ejemplo, para partículas que son oblongas, tubulares, y similares. El tamaño en el cual los materiales despliegan diferentes propiedades comprados con el material en bruto es dependiente del material y se puede ver para muchos materiales de tamaño mayor de 100 nm y aun para algunos materiales mayores en tamaño de 1000 nm. Aunque el tamaño de la mayoría de las moléculas se ajustaría al esquema anterior, las moléculas individuales usualmente no se denominan como nanopartículas.

Las nanopartículas son de gran interés científico ya que ellas son efectivamente un puente entre el material a granel y las estructuras atómicas o moleculares. Una muestra a granel de un material particular debe tener propiedades físicas constantes sin importar su tamaño, pero a nanoescala, a menudo se observan propiedades dependientes del tamaño. Así, las propiedades de los materiales cambian en la medida en que su tamaño se aproxima a la nanoescala y en la medida en que el porcentaje de átomos en la superficie de un material se vuelve significativo. Para materiales a granel mayores de un micrómetro (un micrómetro), el porcentaje de átomos en la superficie es insignificante en relación en el número de átomos en el material a granel. Las propiedades interesantes y algunas veces inesperadas de las nanopartículas son por la tanto mayormente debidas al área de superficie grande del material, que domina las contribuciones hechas por el material a granel pequeño.

Como se utiliza aquí, el término "partícula de pared de célula de levadura" ("YCWP") se refiere a una partícula (por ejemplo, a una micropartícula) derivada de una célula de levadura, es decir, una célula de levadura de ocurrencia natural que tiene al menos un componente de la pared de la célula de levadura modificado, por ejemplo, extraído. Una célula de levadura de ejemplo es la *Saccharomyces cerevisiae*. Las paredes celulares de la *S. cerevisiae* comprenden componentes que incluyen, pero no están limitados a, glucano, quitosano, mannano, proteínas y similares. La instrucción de uno o más de estos componentes de la pared de la célula de levadura de ocurrencia natural resulta en una YCWP. Una YCWP de ejemplo incluye partículas de glucano de levadura (YGP) (o GP), partículas de quitosano de levadura (YCP) y partículas de quitosano/mannano de levadura (YCMP), como se describe en detalle adelante. Con base en su tamaño, las YCWP también se pueden denominar aquí en la técnica como micro partículas. Como se utilizan aquí, las YCWP son típicamente una partícula de pared de célula levadura de 80-85% de pureza de beta glucano.

5 Como se utiliza aquí el término “carga” se refiere a la introducción o inserción de una sustancia u objeto (por ejemplo el termino una carga o nano partícula) en o dentro de una partícula de la invención, por ejemplo, una YCWP, en una ubicación deseada. Como se utiliza aquí, el término “cargar” se refiere a introducir o inserta una sustancia u objeto (por ejemplo una carga nanopartícula) en o sobre la partícula de la invención, por ejemplo una YCWP, en la ubicación deseada. “Cargar” puede además incluir “atrapar” o en enlazar covalentemente las nanopartículas con la YCWP, YGP, o GP. En las realizaciones preferidas de la invención, cargar también incluye atrapar o enlazar la sustancia u objeto en la ubicación deseada, por ejemplo, en un núcleo sobre la superficie de una partícula de la invención, por ejemplo, una YCWP.

10 Como se utiliza aquí el término “carga” se refiere a una sustancia, por ejemplo, a una molécula pequeña o biomolécula (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, etc.) a ser cargada (o cargada) en una YCWP de la invención, solo o en combinación, o en conjunto con una nanopartícula de la invención.

15 Por “proteína” se quiere decir una secuencia de amino ácidos de la cual la longitud de cadena es suficiente para producir mayores niveles de estructura terciaria y/o cuaternaria. Esta se diferencia del “péptido” u otros fármacos de peso molecular pequeño que no tienen tal estructura. Típicamente, la proteína aquí tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferiblemente al menos aproximadamente 20 kD.

“Esencialmente puro” implica una composición que comprende al menos aproximadamente 90% en peso de la molécula deseada, con base en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente 95% en peso. “Esencialmente homogéneo” significa una composición que comprende al menos aproximadamente 99% en peso de la molécula deseada, con base en el peso total de la composición.

20 Por “ácido nucleico” se quiere decir unos biopolímeros comprendidos de monómeros constitutivos, ribo o deoxirribonucleótidos, o análogos de los mismos. “Ácido nucleico” incluyen polinucleótidos de ocurrencia natural, por ejemplo, ADN, ARN, etc. Acido nucleicos sintéticos también son “cargas” de ejemplo que incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos contrasentido, siARN, y similares.

25 Por “molécula pequeña” se quiere decir un compuesto orgánico de peso molecular bajo que es por definición no un polímero. El límite de peso molecular superior de la molécula pequeña de apropiadamente 800 Daltons lo que permite la difusión a través de las membranas celulares, por ejemplo, membranas de célula de mamífero. Las moléculas pequeñas pueden tener una variedad de funciones biológicas, por ejemplo, moléculas de señalización de célula, fármacos, pesticidas (en agricultura), etc. Los compuestos pueden ser naturales o artificiales. Los oligómeros muy pequeños también se pueden considerar “moléculas pequeñas” tales como dinucleótidos, péptidos y disacáridos.

30 El término “fármaco” se refiere a una sustancia que, cuando se absorbe en el cuerpo de un organismo vivo, altera la función normal de cuerpo.

El término “paciente” incluye humano u otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

35 El término “dosis efectiva” o “dosificación efectiva” se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término “dosis terapéuticamente efectiva” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener una enfermedad y/o sus complicaciones en un paciente que ya sufre de la enfermedad.

40 La invención caracteriza a las YCWP, por ejemplo, las YGP o las GP, cargados con moléculas o cargados con moléculas de carga y nanopartículas que tienen funcionalidades deseadas. Las siguientes secciones suministran las descripciones detalladas de los métodos para elaborar y utilizar las YCWP de ejemplo de la invención.

I. Métodos para elaborar las partículas de pared de célula de levadura (YCWP)

45 Las YCWP exhiben propiedades funcionales claves de las levaduras nativas o de ocurrencia natural de las cuales ellas se derivan. Las partículas de pared de célula de levadura extraídas, principalmente debido a su contenido de beta-glucano, son direccionadas a células fagocíticas, tales como macrófagos y células de tejido linfoide. El tejido linfoide asociado a las mucosas (MAT) comprende todas las células linfoides en el epitelio y en la lámina propia que descansa por debajo de las superficies de la mucosa del cuerpo. Los sitios principales de los tejidos linfoides asociados a la mucosa son los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), los tejidos linfoides asociados los bronquios (BALT), y el tejido linfoide asociado a la piel SALT (SALT).

50 Otro componente importante del sistema inmune GI es la célula M o de micro pliegue. Las células M son un tipo de células específicas en el epitelio del intestino sobre los fúnculos linfoides que endocitosan una variedad de proteínas y antígenos de péptidos. En lugar de digerir estas proteínas, las células M las transportan hacia el tejido subyacente, en donde ellas son tomadas por las células dendríticas locales o macrófagos. Las células M son otro objetivo de las

YCWP. Las células M toman moléculas y partículas del lumen del intestino mediante endocitosis y fagocitosis. Este material es luego transportado a través del interior de la célula en vesículas a la membrana celular basal, donde esta es liberada hacia el espacio extra celular. Este proceso es conocido como transcitosis y ha mostrado que ocurre efectivamente para la toma de las YCWP (ver, por ejemplo, Beir and Gebert, *Am J. Physiol.* 1998 July; 275 (1 Pt 1): G130-7 y der Lubben, et al., *J Drug Target*, Septiembre de 2002; 10 (6):449-56. Sin estar ligado por la teoría se cree que la toma de las YCWP en las células, por ejemplo, las células macrófagas, se produce al menos en parte debido a la toma específica mediada por receptor. Por ejemplo, se sabe que los receptores de reconocimiento de patrón de patógeno (PPR) reconocen los motivos estructurales y moleculares comunes presentes en las superficies microbianas y que los receptores de mannososa y los receptores beta glucano, en particular, participan en el reconocimiento de patógenos fúngicos.

El receptor de mannososa (MR) un receptor-de carbohidrato expresado en subconjunto de macrófagos, es considerado uno de tales PRR. Los macrófagos tienen receptores para tanto la mannososa como la mannososa -6-fosfato que se pueden unir e internalizar moléculas que despliegan estos azúcares. Las moléculas son internalizadas mediante endocitosis en un fago soma prelisosomal. Esta internalización se ha utilizado para mejorar de los oligonucleótidos es macrófagos utilizando serum albumina bobina modificada con mannososa-6-fosfato y ligado a una oligodeoxinucleotido por un puente de disulfuro a un extremo 3' modificado, ver, por ejemplo, Bonfils, et al., *Nucl. Acid Res.* 1992 20, 4621-4629; and Bonfils, et al., *Bioconj. Chem.*, 3, 277-284 (1992.)

Los macrófagos también expresan los receptores de beta-glucano, que incluyen el receptor 3 de complemento (CR3) (Ross, et al., 1987, *Complement Inflamm.* 4:16), dectina-1 (Brown and Gordon. 2001. *Nature* 413:36), y lactosilceramida (Zimmerman et al., *J Biol. Chem.* 1998 Aug. 21:273 (34): 22014-20). El receptor de beta-glucano, CR3 es predominantemente expresado sobre monocitos, neutrófilos y células NK, mientras que la dectina-1 es predominantemente expresada sobre la superficie de células de macrófagos. La lactosilceramida se encuentra en altos niveles en células M. las microbia también puede expresar un receptor beta-glucano (Muller, et al., *Res Immunol.* 1994 May; 145 (4): 267-75). Existe evidencia de efectos adictivos sobre la fagocitosis al unir tanto los receptores de mannososa como de beta-glucano. (Giannis, J., et al *Leukoc Biol.* 1993 December; 54 (6): 564-71).

En algunas realizaciones, se pueden utilizar sistemas de suministro a base micro esfera de beta 1,3-D-glucano hueco que incorpora cargas como complejos de polímero. Las moléculas de carga pueden incluir, por ejemplo, moléculas de plásmido/mARN, moléculas de proteína, nanopartículas, siARN/oligonucleótidos, hasta 200% p/p de moléculas pequeñas. En ciertas realizaciones, el cosuministro multiplexado de diferentes cargas es posible. En varias modalidades, se puede efectuar la toma mediada por el receptor de glucano mediante las células que presentan antígeno. Los métodos de la invención se pueden utilizar para suministrar carga o cargas a las células dendríticas, macrófagos y tejidos que contiene estas células.

Las partículas de la pared de célula de levadura extraídas de ejemplo (YCWP) son partículas fácilmente disponibles, biodegradables, sustancialmente esféricas de aproximadamente 2-4 um de diámetro. La preparación de las partículas de pared de célula de levadura extraída es conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Números. 4,992,540,5,082,703,5,032,401,5,322,841,5,401,727,5,504,079,5,968,811,6,444,448 B1, 6, 476,003 B1, las solicitudes U.S publicadas 2003/0216346 A1, 2004/0014715 A1, y la solicitud publicada PCT WO 02/12348 A2.

Una forma de partículas de pared de celular de levaduras extraídas, denominadas como "partículas de glucano completas" de (WGP), se han descrito en la técnica y se sugieren como vehículos de suministro de, por ejemplo, moléculas pequeñas y otro de moléculas de carga. El uso de los WGP solos como vehículos de suministro, sin embrago, se limita a liberar mediante difusión simple el ingrediente activo de la partícula o liberar un agente químicamente reticulado a la partícula de glucano completa mediante biodegradación de la matriz de partícula. Ver las patentes U.S. Números. 5, 032,401 y 5, 607,677. De acuerdo con esto, una característica clave de la invención puede descansar en la modificación de las metodologías WGP para facilitar la retención mejorada y/o el suministro de moléculas de carga. Tales mejoras construyen los WGP reconocidos en la técnica pero caracterizan moléculas de atrapado en nanopartículas así como también pluralidades de dichas moléculas de atrapado y nanopartículas, formuladas en formas específicas para lograr las propiedades de suministro mejoradas deseadas. Como se utilizan aquí, un WGP es típicamente una partícula de glucano completa de >90% de pureza de beta glucano.

A. Preparación de las partículas de glucano

Las partículas de glucano (GP), también son denominadas aquí como partículas de glucano de levadura ("YGP"), son un "fantasma" de célula de levadura hueca purificada que contiene una esfera rica β -glucano, generalmente de 2-4 micrómetros de diámetro. En general, las partículas de glucano pueden ser preparadas de células de levadura mediante la extracción y porción de la fracción de glucano insoluble en alcali proveniente de las paredes de la célula de levadura. Las células de levadura pueden ser tratadas con una solución de hidróxido acuoso sin afectar las paredes de la célula de levadura, que digieren la proteína y la porción intracelular de la célula, dejando el componente de la pared de glucano desprovisto de contaminación significativa de proteína, y que tiene sustancialmente la estructura de pared celular inalterada de glucanos β (1-6) y β (1-3) ligados. La caparazón de 1,3-

β -glucano suministra una toma mediada por receptor por las células fagocitas que expresan los receptores de β -glucano.

Ciertas partículas de glucano, pueden ser hechas como sigue: Las células de levadura (*S. cerevisiae* cepa R4) pueden crecer en fase logarítmica en medio mínimo bajo condiciones de fermentación con tanda de alimentación. Las células pueden ser cosechadas mediante centrifugación de tanda, por ejemplo a aproximadamente 2000 rpm durante aproximadamente 10 minutos. Las células pueden ser entonces lavadas en agua destilada y luego resuspendidas en 1 litro de NaOH 1M y calentadas a 90 grados Celsius. La suspensión de la célula se puede agitar vigorosamente durante una hora a esta temperatura. El material insoluble, que contiene las paredes celulares, se puede recuperar mediante centrifugación. Este material se puede entonces suspender en NaHO 1M y calentar. La suspensión se puede agitar vigorosamente durante una hora a esta temperatura. La suspensión se le permite entonces enfriarse hasta temperatura ambiente y la extracción puede continuar durante 16 horas adicionales. El recibo disoluble se puede recuperar mediante centrifugación. Este material puede ser finalmente extraído en agua llevado a un pH 4.5 con HCL. El recibo disoluble se puede recuperar mediante centrifugación y lavar tres veces con agua, isopropanol y acetona. La suspensión resultante se puede colocar en bandejas de vidrio y secar bajo presión reducida para producir un polvo blanco fino.

Una descripción más detallada de los procesos para preparar las partículas anteriores se puede encontrar en las patentes U.S. Números. 4,810, 646; 4, 992,540; 5, 028,703; 5, 607,677 y 5, 741,495. Por ejemplo, la patente U.S. Número. 5, 028,73 divulga que las partículas WGP de levadura pueden ser reproducidas de células de levadura en cultivo de fermentación. Las células se pueden cosechar mediante centrifugación de tanda a 8000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Sorval RC2-B. Las células pueden ser entonces lavadas dos veces en agua destilada con el fin de prepararlas para extracción del glucano completo. La primera etapa involucra resuspender la masa de células en un 1 litro al 4% p/v de NaOH y calentar a 100 grados Celsius. De la suspensión de células se puede agitar vigorosamente durante 1 hora a esta temperatura. El material insoluble que contiene las paredes celulares se puede recuperar al centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos. Este material se puede entonces suspender en 2 litros 3% p/v de NaOH y calentar a 75 grados Celsius. La suspensión se puede agitar vigorosamente durante 3 horas a esta temperatura. A la suspensión se le permite entonces enfriarse hasta temperatura ambiente y la extracción puede continuar durante 16 horas adicionales. El recibo insoluble se puede recuperar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos. Este material se puede finalmente extraer en 2 litros, 3% p/v de NaOH llevado a un pH 4.5 con HCL a 75 grados Celsius durante 1 hora. El residuo en soluble se puede recuperar mediante centrifugación y lavar tres veces con 200 mililitros de agua, una vez con 200 mililitros de etanol deshidratado y dos veces con 200 mililitros de éter etílico deshidratado. La suspensión resultante se puede colocar en placas Petri y secar.

Los grados variantes de pureza de las partículas de glucano se pueden lograr al modificar el proceso de extracción/purificación. Como se utiliza aquí, los términos YCWP, YGP, y GP describen una microesfera hueca de 2-4 micrómetros (o un fantasma de la pared celular de levadura) purificada de la levadura de Baker utilizando una serie de etapas de extracción alcalina, ácida y orgánica como se detalló anteriormente. En general, estos GP son del orden de 80-85% de pureza sobre un beta glucano con base p/p y, luego de la introducción de la carga, el atrapamiento y otros componentes, tiene un poco menos de "pureza". En las realizaciones de ejemplos las GP son < 90% de pureza de beta glucano.

Las GP se han utilizado para suministro direccionado de macrófagos de cargas útiles solubles (ADN, siARN, proteína, moléculas pequeñas) encapsuladas dentro de las GP huecos por vía de un políplex de núcleo y estrategias sintéticas capa por capa (LbL).

B. Preparación de las partículas YCP

Las células de levadura (*Rhodotorula sp.*) derivada de cultivos obtenidos de la colección americana de cultivos tipo (ATCC, Manassas, Va.) puede crecer aeróbicamente a la fase estacionaria en YPD a 30 grados Celsius. Los cultivos de *Rhodotorula sp.* Disponibles del ATCC incluyen los números 886, 917, 9336, 18101, 20254, 20837 y 28983. Las células se pueden cosechar mediante centrifugación en tanda a 2000 rpm durante 10 minutos. Las células se pueden entonces lavar una vez en agua destilada y luego resuspender en agua llevada a un pH de 4.5 con HCL, a 75 grados Celsius durante 1 hora. El material insoluble que contiene las paredes celulares se puede recuperar mediante centrifugación. Este material se puede entonces suspender en 1 litro, de NaOH 1M y calentar a 90 grados Celsius durante 1 hora. La suspensión se puede entonces permitir hasta enfriar a temperatura ambiente y la extracción se puede continuar durante 16 horas adicionales. El residuo insoluble se puede recuperar mediante centrifugación y lavar dos veces con agua, isopropanol y acetona. La suspensión resultante se puede colocar en bandejas de vidrio y secar a temperatura ambiente para producir 2.7 g de un polvo de color marrón claro fino.

En realizaciones alternativas, las YGP, por ejemplo, las YGP activados, se pueden injertar con quitosano sobre la superficie, por ejemplo, para incrementar la superficie total del quitosano. El quitosano puede además ser acetilado para formar quitina, en ciertas realizaciones (YGSP). Se puede ver que tales partículas tienen propiedades equivalentes cuando se ven *in vivo*, en el sistema inmune de un sujeto o paciente.

C. Preparación de las partículas YGMP

- 5 S. *cerevisiae* (100 g de levadura Fleishmans Bakers) se puede suspender en un 1 litro de NaOH 1M y calentar a 55 grados Celsius. La suspensión de la célula se puede mezclar durante 1 hora a esta temperatura. El material insoluble que contiene las paredes celulares se puede recuperar al centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material se puede entonces suspender en 1 litro de agua y llevar a un pH 4-5 con HCL, e incubar a 55 grados Celsius durante 1 hora. El residuo insoluble se puede recuperar mediante centrifugación y lavar una vez con 1000 mililitros de agua, cuatro veces con 200 mililitros de isopropanol deshidratado y dos veces con 200 mililitros de acetona. La suspensión resultante se puede colocar en una bandeja de vidrio y secar a temperatura ambiente para producir 12.4 g de un polvo fino, blancuzco.
- 10 El S. *cerevisiae* (75 g SAF-Mannan) se puede suspender en 1 litro de agua y ajustar a un pH 12-12.5 con NaOH 1M y calentar a 55 grados Celsius. La suspensión de la célula se puede mezclar durante una 1 hora a esta temperatura. El material insoluble que contiene las paredes celulares se puede recuperar al centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material se puede entonces suspender en 1 litro de agua y llevar a un pH 4-5 con HCL e incubar a 55 grados Celsius durante 1 hora. El residuo insoluble se puede recuperar mediante centrifugación y lavar una vez con agua, isopropanol deshidratado y acetona. La suspensión resultante se puede colocar en una bandeja de vidrio y secar a temperatura ambiente para producir 15.6 g de un polvo fino ligeramente blancuzco.
- 15

II. Moléculas de carga y Nanopartículas

20 Los sistemas de suministro de partículas descritos aquí son útiles para suministro *in vivo* o *in vitro* de moléculas de carga, opcionalmente, en combinación o asociados con nanopartículas complementarias. Las moléculas de carga de ejemplo incluyen, pero no están limitadas a, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y enzimas. Además de los ácidos nucleicos, las proteínas y los péptidos, los sistemas de suministro de material constituido por partículas son adecuadas para el suministro de moléculas más pequeñas, preferiblemente para el suministro del agente farmacéuticamente activo, más preferiblemente moléculas terapéuticas pequeñas.

25 Las preparaciones de las moléculas de carga son preferiblemente esencialmente puras y deseablemente esencialmente homogéneas (es decir libre de moléculas contaminantes, etc.) Las nanopartículas de ejemplo incluyen, pero no están limitadas a estirenos fluorescentes, estirenos no fluorescentes, puntos cuánticos, partículas paramagnéticas y ferromagnéticas tales como óxidos de hierro, y nanopartículas de oro. Las nanopartículas diferentes de los ejemplos anteriores se pueden utilizar en la presente invención en tanto que las GP se pueden cargar efectivamente con nanopartículas que utilizan los métodos descritos adelante.

30 Otras nanopartículas de ejemplo incluyen, pero no están limitadas a, plástico, vidrio, silicio, cerámicas poliméricas (por ejemplo, PGLA), óxidos, metal y otras partículas, marcadas, no marcadas, funcionalizadas y similares. Esencialmente las nanopartículas de cualquier composición se pueden contemplar para uso en la invención, dado que ellas cumplen la restricción de tamaño para cargarlas dentro de las partículas de la invención o contienen una manija química para absorber o enlazar químicamente nanopartículas mayores a las partículas de superficie

35 externas de la invención.

III. moléculas que atrapan carga

40 Las realizaciones de ejemplo en la invención caracterizan moléculas carga y/o nanopartículas, opcionalmente en combinación o asociadas con moléculas de atrapado complementario, para facilitar una o más de las propiedades de suministro deseadas (por ejemplo, liberación sostenida, protección de carga, etc.) la molécula que atrapa carga es preferiblemente una molécula farmacéuticamente aceptable. La molécula de carga y atrapado puede ser soluble en el sistema solvente; el sistema solvente puede ser absorbido a través de la matriz de carbohidrato de partícula de célula de levadura que permite la absorción del polímero de carga y atrapado. La molécula de carga y atrapado puede ser soluble en agua. En realizaciones preferidas, la molécula de atrapado es biodegradable

45 El mecanismo de acción de la reacción de atrapado con una carga dada dicta la selección de la molécula que atrapa carga. Para las interacciones electroestáticas se requiere una molécula cargada que atrapa carga de carga opuesta a la de la carga. Para atrapamiento físico, la molécula que atrapa carga participa adecuadamente en la formación de una matriz que reduce la difusión de una carga. En otras realizaciones, la molécula que atrapa carga contribuye a una propiedad de unión hidrófoba que contribuye a la retención de la carga. En realizaciones adicionales, la molécula que atrapa carga se une selectivamente a la carga, que suministra una interacción de afinidad que

50 contribuye a la retención de la carga.

En general, los polielectrolitos pueden ser moléculas adecuadas que atrapan carga. Varios polielectrolitos adecuados se divulgan en las patentes U.S. Números. 7, 740,861 y 6, 133,229. El polielectrolito puede ser un polielectrolito catiónico o aniónico. También se puede emplear polielectrolitos anfotéricos. El polielectrolito catiónico es preferiblemente un polímero con grupos catiónicos distribuidos a lo largo de la cadena molecular. Los grupos

catiónicos, que en ciertas realizaciones pueden incluir porciones cuaternarias derivadas de amoniaco, se pueden disponer en grupo laterales colgantes de la cadena o se pueden incorporar en esta. Ejemplos de polielectrolitos catiónicos incluyen: Poliacrilamida sustituida, polietilenimina, polipropilenimina y derivados sustituidos; homopolímeros de poliamina; copolímeros de poliamina (por ejemplo condensados de epiclorohidrina y mono dimetilamina); cloruro de polidialildimetil amonio; dextranos sustituidos; goma guar modificada (sustituida con cloruro de hidroxipropitrimonio); proteínas sustituidas (por ejemplo grupos cuaternarios sustituidos sobre proteína de soya y colágeno hidrolizado); ácidos poliamino (por ejemplo, polilisina); compuestos poliamino de peso molecular bajo (por ejemplo espermina y espermidina) y proteínas catiónicas, tales como protamina. Se pueden emplear polímeros naturales o artificiales. Los polielectrolitos catiónicos con PM 150 a 5.000.000, preferiblemente 5000 a 500.000, más preferiblemente 500 a 100.000 se pueden emplear. Una cantidad de 0.01 a 10% se prefiere, más preferiblemente 0.1 a 2% P/V, especialmente 0.05 a 5%.

El polielectrolito aniónico es preferiblemente un polímero con grupos aniónicos distribuidos a lo largo de la cadena molecular. Los grupos aniónicos que pueden incluir carboxilato, sulfonato, sulfato y otros agrupamientos ionizables cargados negativamente, pueden ser despagados en grupos colgantes de la cadena o directamente enlazados a la estructura del polímero. Se pueden emplear polímeros naturales o artificiales.

Ejemplos de polielectrolitos aniónicos incluyen: un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico, un copolímero de metil vinil éter y ácido maleico, ácido algínico y sales; carboximetil celulosa y sales; poliacrilamidas sustituidas (por ejemplo sustituidas con grupos ácidos carboxílicos); ácidos poliacrílicos y sales; ácidos poliestirenos sulfónicos y sulfatos dextrano; sacáridos sustituidos por ejemplo octasulfato de sacarosa; heparina. Los polielectrolitos aniónicos con PM de 150 a 5.000.00 se pueden utilizar, preferiblemente 5000 a 500.000, más preferiblemente 5000 a 100.000. Una cantidad de 0.01% a 10% es preferiblemente especialmente 0.05% a 5% más especialmente 0.1 a 2% p/v

Los polímeros biológicos, tales como polisacáridos, son polímeros de atrapados preferidos. Preferiblemente, los polímeros son procesados a un peso molecular promedio de menos de 100,000 Daltons. Los polímeros son preferiblemente derivados para suministrar características catiónicas o aniónicas. Los polisacáridos adecuados incluyen quitosano (quitina desacetilada), alginatos, dextranos, tales como dextrano de 2-(dietilamino) etil éter (DEAE-dextrano) y sulfato de dextrano, xantanas, gomas de algarroba y gomas guar.

Los lípidos catiónicos también son conocidos en la técnica por ser adecuados para transfección. Los lípidos catiónicos adecuados incluyen cloruro de N-[1-(2,3- dioleiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), yoduro de [N,N,N',N-tetrametil-N,N'-bis (2hidroxietil)-2,3-di(oleiloxi)-1,4-butanodiamonio], dioctadecilamidoglicil espermina, metilsulfato N-[1-(2,3-Dioleiloxi)]-N,N,N-trimetilamonio propano (DOTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy) propil]-N,N,N-trimetilamonio, bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio (DMRIE), dimiristoleoil fosfometil trimetil amonio (DMPT), sal 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadia-zol-4-il), sal de amonio, cloruro de 1,2-dioleoli-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dioleoil-sn-glicerol-fosfoetanolamina y 1,3-dioleiloxi-2-(6-carboxiespermil) propilamida (DOSPER).

IV. Componentes de carga en partículas de pared celular de levadura, por ejemplo, partículas de glucano de levadura

La invención caracteriza nanopartículas, opcionalmente en combinación o asociadas con moléculas de carga, obtenidas, en realizaciones de ejemplo al cargar las nanopartículas y/o las moléculas de carga en o sobre las YCWP, por ejemplo, las YGP. Como se utiliza aquí, una YGP es típicamente una partícula de glucano de levadura de 80-85% de pureza de beta glucano.

A. Componentes solubles de carga

Una variedad de métodos de moléculas de carga que se cargan y/o partículas de glucano con moléculas que atrapan carga se describen en detalle en la Patente US 7, 740, 861 y en la solicitud US NO. 12/260, 998, publicada como US 20090226528. En algunas realizaciones, ambas, la molécula de carga así como también las moléculas que atrapan carga son solubles en el mismo solvente. En ciertas realizaciones el solvente puede ser agua o un solvente orgánico. En varias realizaciones, el solvente es agua.

B. Cargas poliplexadas

Las cargas poliplexadas encapsuladas dentro de partículas de glucano se pueden preparar al introducir primero moléculas de carga en la partícula de glucano para formar un núcleo. En algunas realizaciones, el núcleo se puede hacer de ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, proteínas o péptidos, moléculas naturales o sintéticas y/o polímeros, complejos inorgánicos y otras partículas sintéticas, orgánicas, inorgánicas o biológicas. Las moléculas de carga pueden ser entonces recubiertas con una molécula que atrapa carga para dar como resultado una carga poliplexada. En algunas realizaciones, la molécula que atrapa carga es un polímero. En ciertas realizaciones, la

molécula que atrapa carga está cargada opuestamente a la molécula de carga. Por ejemplo, si la molécula de carga es un ácido nucleico, el núcleo es aniónico. El núcleo aniónico puede ser recubierto con un polímero catiónico como una molécula que atrapa carga para formar la carga poliplexada resultante encapsulada dentro de la partícula de glucano. Una variedad de métodos para elaborar cargas poliplexadas encapsuladas por una partícula de glucano se describen en detalle en la patente US 7, 740, 861 y en "Characterization of Multilayered Nanoparticles Encapsulated in Yeast Cell Wall Particles for DNA Delivery" by Ernesto R. Soto and Gary R. Ostroff, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19 (4), PP. 840-848.

Las ventajas de las cargas poliplexadas incluyen: gran capacidad de carga, facilidad de síntesis de las formulaciones núcleo en capas multiplexadas que contienen macromoléculas (es decir las proteínas de ADN, siARN) mantenidas juntas por vía de interacciones no covalentes con polímeros de atrapado, y la liberación controlada en las cuales las capas de carga más externas se liberan primero.

C. Síntesis por capa de las cargas en GP

Una variedad de métodos de la síntesis capa por capa de las cargas en GP se describe en detalle en la solicitud No. 12/260, 998, publicada como US 20090226528. Como se utiliza aquí, un GP es típicamente una partícula de glucano derivada de levadura de 80-85% de pureza de beta glucano.

Las GP se pueden desarrollar utilizando un automontaje capa por capa (LbL) de nanomateriales mantenidos juntos mediante interacciones electrostáticas con el fin de suministrar materiales de nanopartícula que protegen y suministran las moléculas de carga a las células. Las moléculas de carga de ejemplo son moléculas de carga a base de ácido nucleico e incluyen, pero no están limitadas a moléculas de ADN, por ejemplo vectores, casetes, etc. moléculas de ARN, por ejemplo moléculas de ARN que codifican proteínas, miARN, siARN, los ARN de horquilla, ARN contrasentido, etc., ribosimas, y similares. La tecnología del suministro de agente de carga se puede basar en la capa in situ mediante síntesis de capa de nanopartículas enjauladas dentro de partículas huecas de pared celular de levadura (YCWP). La YCWP suministra protección y facilita el suministro oral y sistémico direccionado al receptor de las moléculas de carga a células fagocíticas.

En realizaciones particulares, las partículas de pared celular de levadura pueden ser un material efectivo para encapsular cargas luego del montaje capa por capa de los polímeros mediante interacciones electrostáticas enjauladas dentro de la YCWP hueco. La marcación de cada capa con moléculas fluorescentes, tales como rodamina fluoresceína, Cy3, y similares, pueden permitir el análisis de fluorescencia cuantitativa y la optimización de la formación del nanoplex LbL dentro del YCWP.

Las YCWP son microesferas de 2-4 micrómetros huecas porosas preparadas de la levadura de Baker compuesta principalmente o primariamente de beta1, 3-D-glucano nanoproteína ciquitina. Los núcleos de nanopartículas compuestos de polímeros aniónicos y catiónicos se pueden construir de tARN y PEI dentro del YCP. Estos núcleos de nanopartículas catiónicas encapsuladas de YCWP se pueden utilizar para absorber cargas sobre la superficie de nanopartículas y luego ser recubiertas con PEI.

El tARN, ADN, (o siARN) o PEI marcado con rodamina se pueden utilizar para optimización de la formación de cada capa de las nanopartículas encapsuladas. Se puede utilizar una curva de calibración de cada compuesto marcado para unión cuantitativa.

Las nanopartículas dentro de la YCWP pueden consistir de un núcleo de tARN/polietilenoimina (PEI) seguido por una capa de ADN que es finalmente recubierta con una capa protectora de PEI. Utilizando la marcación de rodamina del tARN, PEI y ADN, la formación capa por capa de las nanopartículas se puede visualizar mediante microscopia fluorescente y cuantificar mediante espectroscopia de fluorescencia y citometría de flujo. Las realizaciones tales como las anteriores, en donde los componentes no están marcados también están claramente dentro del alcance de la invención.

Carga de YCWP

Las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) se pueden cargar con nanopartículas de varias diferentes maneras. En algunas realizaciones, las partículas se pueden instalar sobre la superficie exterior de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano). En ciertas realizaciones, las nanopartículas se pueden encapsular dentro de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) de tal manera que ellas están incrustadas dentro de la matriz de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano). En varias realizaciones, las nanopartículas se pueden encapsular dentro de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) de tal manera que ellas están incrustadas dentro de la cavidad interior de las YCWP huecos (por ejemplo partículas de glucano).

Una ventaja de la carga de las nanopartículas sobre la superficie exterior es que las nanopartículas de un tamaño mayor de 40 nm se pueden instalar de manera efectiva sobre la coraza de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) y suministrar a un sitio objetivo que utiliza suministro mediado por glucano.

5 Una variedad de ligadores se pueden utilizar para cargar las nanopartículas sobre la superficie exterior de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano). Se pueden instalar diferentes nanopartículas en diferentes sitios anatómicos de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano). En algunas realizaciones, el enlazador se puede unir o separar de las nanopartículas y/o las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) por vía de una reacción química reticulada reversible. En varias realizaciones, el ligador se puede unir o separar de las nanopartículas y/o las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) por vía de un cambio en el pH, un cambio en el potencial redox, hidrólisis, o mediante métodos enzimáticos. Un experto apreciará los varios métodos que están disponibles para tal reticulación reversible de los grupos. En ciertas realizaciones, el ligador puede ser un disulfuro, acetal, cetel, ortoéster o un grupo éster. En varias realizaciones, el ligador puede ser una unidad péptido.

15 Una vez que las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) han suministrado las nanopartículas instaladas sobre la cubierta exterior al sitio objetivo, el enlace de las nanopartículas a las YCWP exteriores (por ejemplo, partículas de glucano) se puede romper, por ejemplo debido a hidrólisis. En algunas realizaciones, el enlace se puede romper como resultado de fagocitosis de la coraza externa del YCWP. Una vez que el enlace de las nanopartículas de la coraza externa de la YCWP se rompe, la forma libre de las nanopartículas se puede suministrar a sitio objetivo según se desea.

20 En algunas realizaciones, las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) se pueden tratar con agentes oxidantes tales como periodato seguido por formación de base Schiff con aminos tales como biotina-NH₂, ciclodextrina-NH₂, proteína/péptido, alquilaminas, poliaminas, aminocarboxilatos/fosfatos/sulfatos, y alquino-NH₂. Una reducción de la base Schiff que utiliza agentes reductores tales como boro hidrato de sodio puede resultar en la carga superficial de varias moléculas de carga tales como biotina, ciclodextrinas, proteínas, alquinos y aminocarboxilatos.

E. Carga de nanopartículas de las YCWP (por ejemplo, las YGP o las partículas de glucano)

25 La Figura 1 muestra unos esquemas de ejemplo que describen la estrategia de carga de la nanopartícula dentro (o sobre la superficie de) una YCWP, a saber una YGP de la invención. En algunas realizaciones, las nanopartículas se pueden instalar o encapsular dentro de las YCWP, por ejemplo, las YGP o las GPS (también denominado aquí como corazas de glucano). Un mecanismo de “halado-empuje” se puede emplear para encapsular efectivamente las nanopartículas justo dentro de la partícula, por ejemplo, la coraza de tal manera que las nanopartículas estén incrustadas en la matriz, o de todas maneras dentro de la cavidad interior de la partícula, por ejemplo, la coraza hueca de glucano. El mecanismo de “halado-empuje” puede comprender la acción de difusión capilar “halar” las nanopartículas a través de la matriz de la partícula, por ejemplo, la matriz de coraza de glucano y luego, una etapa de secado mediante, por ejemplo, liofilización, de la partícula seca, por ejemplo, partícula de glucano, glucano seca, se puede rehidratar para “empujar” la carga de nanopartícula dentro de la partícula. El concepto de “halar-empujar” vs. “halar y empujar” puede describir la misma acción.

40 Cuando las cargas se cargan (incluyendo las cargas NP), cargar se puede efectuar utilizando volúmenes “subhidrodinámicos”. La expresión volumen “subhidrodinámico” se puede utilizar para caracterizar el volumen de absorción acuoso de las YCWP (por ejemplo, las YGP o las GP). Típicamente, las YCWP (por ejemplo, las YGP) pueden absorber 10 veces su peso en agua (o solvente, por ejemplo, solvente acuoso). En algunas realizaciones, el agua (o solvente, por ejemplo, solvente acuoso) que está en una cantidad 5 veces el peso de la YCWP (por ejemplo, YGP) se puede utilizar como un volumen “subhidrodinámico” para cargar una carga en las YCWP (por ejemplo, las YGP). La carga puede dar como resultado una pasta uniformemente húmeda de partículas que contienen carga. En ciertas realizaciones, un volumen subhidrodinámico es de aproximadamente 50% del volumen de absorción acuoso máximo de las YCWP. En ciertas realizaciones, el volumen subhidrodinámico es de aproximadamente 10-50% (es decir, aproximadamente 10, 20, 30, 40, o 50%) del volumen de absorción acuoso máximo de las YCWP. En otras realizaciones, el volumen subhidrodinámico es de aproximadamente 50-90% (es decir, aproximadamente 50, 60, 70, 80 o 90%) del volumen de absorción acuoso máximo de las YCWP. La persona experta apreciará que alterar el volumen subhidrodinámico dará como resultado suspensiones (por ejemplo pastas) que son más o menos de naturaleza húmeda, el último de los cuales puede facilitar la carga.

50 Una ventaja de este método es que si una carga (por ejemplo NP) está por fuera del YCWP, por ejemplo, coraza de partícula de glucano, cuando se agrega un polímero atrapante, entonces la reacción entre la carga y el polímero que atrapa también puede ocurrir por fuera del YCP, por ejemplo, coraza de glucano, y en efecto ese material no está encapsulado. Típicamente, cuando se efectúa un primer (por ejemplo, primario) volumen subhidrodinámico la reacción de carga > 85% de la carga se puede absorber, o “halar” dentro del límite de la coraza de glucano mediante acción capilar y la carga se puede encapsular luego de la adición del polímero que atrapa.

Este fenómeno puede dejar hasta aproximadamente 15% de la carga por fuera. Para reducir la cantidad de carga (por ejemplo NP) por fuera del YCWP, por ejemplo, coraza GP, las partículas cargadas con carga se pueden secar,

por ejemplo, mediante liofilización, secado por rociado, etc. La etapa de reacción de carga del volumen subhidrodinámico se puede repetir con solvente (por ejemplo solvente acuoso, por ejemplo, amortiguador o agua) solamente. Luego de la adición del solvente la carga por fuera de las corazas se puede redissolver y barrer dentro de las partículas o corazas mediante acción capilar mientras que las partículas/corazas (las YCWP, por ejemplo, las YGP) se rehidratan

Este fenómeno se puede denominar como “reacción” de “empujado” en la medida en que este no solamente empuja la carga dentro de la acción capilar como en la reacción de carga primaria, sino que este empuja cualquier carga que esté en el límite de la coraza de glucano misma en la cavidad hueca interna de la partícula. Como resultado aproximadamente > 85% del material restante por fuera puede ser ahora cargado dentro del GP que rinde aproximadamente < 5% de la carga por fuera en el producto final. Si es necesario este empuje (por ejemplo empuje de agua) se puede repetir veces adicionales, (por ejemplo, 1, 2, 3, o más veces) para conseguir formulaciones más limpias.

En algunas realizaciones, las series de hidratación/secado de las etapas se puede efectuar en etapas secuenciales (hidratación- liofilización-hidratación). En ciertas realizaciones, el proceso secuencial se puede efectuar como un proceso continuo. En varias realizaciones, las etapas se pueden efectuar mediante secado por rociado, o utilizar secado de lecho fluidizado.

En algunas realizaciones, se pueden cargar nanopartículas de 2-20 nm en las partículas de glucano con más de 40% de carga. En ciertas realizaciones, las nanopartículas de 10-40 nm (por ejemplo 21-40 nm) se pueden cargar en las partículas de glucano con aproximadamente 30-40% de carga. En varias realizaciones, las nanopartículas con un tamaño mayor de 40 nm se pueden cargar en las partículas de glucano con menos de aproximadamente 30% de carga.

En algunas realizaciones, se pueden cargar partículas rojas fluorescentes. En ciertas realizaciones, se pueden cargar nanopartículas verdes fluorescentes. En varias realizaciones, tanto las nanopartículas rojas como verdes se pueden cargar simultáneamente en la partícula de glucano. En ciertas realizaciones, diferentes especies de nanopartículas se pueden suministrar simultáneamente a un sitio objetivo.

Las suspensiones de las YCWP y los NP pueden incluir, en realizaciones de ejemplo, los NP a una concentración de $1-10 \times 10^{15}$ partículas/ml, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 5×10^{15} partículas/ml, mezclados, por ejemplo, con las YCWP secos, (las YGP) en proporciones de 1mg/5µl NP de suspensión. Las proporciones de ejemplo de las suspensiones de YCWP a NP (p/v) incluyen, por ejemplo, 0.1 a 0.5 mg/µl, por ejemplo 0.2 mg de la suspensión YCWP/µl NP.

Las suspensiones de ejemplo, por ejemplo, las suspensiones NP se pueden hacer en solventes acuosos, por ejemplo, amortiguadores, soluciones salinas o agua. La esterilización de ejemplo puede hacerse en alcohol, por ejemplo, soluciones de etanol.

F. Procedimientos Experimentales.

En algunas realizaciones, las nanopartículas se pueden cargar al modificar el tamaño del poro de la matriz YCWP. En ciertas realizaciones, las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) se pueden tratar con dimetil sulfóxido en una solución de urea, de tal manera que algunas de las fibras de la coraza de las YCWP se solubilice originando de esta manera un adelgazamiento por fuera de la matriz de la pared de la coraza. En varias realizaciones, las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) se pueden tratar con enzimas tales como por ejemplo, zimolasa. La digestión enzimática de las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) pueden originar la degradación parcial de la coraza de la YCWP originando la remoción de algunas de las fibras que conducen al incremento en el tamaño del poro de la matriz YCWP.

En ciertas realizaciones, las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) se pueden someter a una alta temperatura en presencia de ácidos diluidos tales como el ácido clorhídrico o el ácido acético a un pH de aproximadamente 3-4 en un autoclave. Tal tratamiento puede hidrolizar algunos de los enlaces de glucano que originan un incremento en el tamaño del poro de la matriz YCWP (por ejemplo partículas de glucano).

En algunas realizaciones, las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) se pueden tratar con ácido nitroso. Tal tratamiento puede originar la hidrólisis de la quitina en la pared celular, reduciendo de esta manera la extensión de la reticulación, haciendo las partículas más fácilmente/rápidamente extraíbles y originando un incremento en el tamaño del poro de la matriz YCWP.

G. Nanopartículas Poliméricas

Una variedad de nanopartículas poliméricas se pueden cargar sobre/en las YCWP (por ejemplo partículas de glucano) y suministrar efectivamente al objetivo. En algunas realizaciones, se pueden suministrar nanopartículas marcadas, por ejemplo, marcadas fluorescentemente. En ciertas realizaciones, se pueden suministrar nanopartículas poliméricas comercialmente disponibles. En varias realizaciones, las nanopartículas poliméricas pueden ser de aproximadamente 10-100 nm de tamaño. Más preferiblemente, las nanopartículas poliméricas pueden ser de aproximadamente 20-40 nm de tamaño. Como una prueba del concepto, las nanopartículas de poliestireno de varios tamaños se pueden cargar en las GP para ejemplificar las GP- NP de la invención.

Las nanopartículas de poliestireno fluorescente modificadas con carboxilato de 20 y 40 nm (Invitrogen) fueron cargadas dentro de las partículas de glucano utilizando el mecanismo de empuje- halado y atrapado dentro de las partículas de glucano utilizando moléculas que atrapan cargas tales como los polímeros catiónicos, por ejemplo, el polietileno imina (PEI). Los grupos de ácido carboxílico permiten la unión electrostática con los polímeros catiónicos o el enlace covalente de proteínas u otros materiales poliméricos por vía de la reticulación EDAC. El clorhidrato de 1-Etil-3[3-dimetil aminopropil] carbodiimida (EDC o EDAC) es un agente reticulante de longitud cero utilizado para acoplar grupos carboxilo a aminas primarias. El EDAC es un reticulador de carbodiimida soluble en agua que activa los grupos carboxilo para reacción espontánea con las aminas primarias, posibilita la inmovilización del péptido y la conjugación de la proteína hapteno-portador.

Están disponibles una variedad de métodos para que la persona experta detecte la carga de las nanopartículas en las YCWP, por ejemplo, partículas de glucano y monitorice la extensión de su toma en las células. La microscopía de fase de luz, contraste u fluorescente, por ejemplo, se puede utilizar para detectar la carga de las nanopartículas en las YCWP, por ejemplo, partículas de glucano, y monitorizar la extensión de su toma en las células. Utilizando microscopía fluorescente, es posible la visualización de las partículas de glucano cargadas con nanopartículas de poliestireno fluorescente modificadas con carboxilato de 20 nm o 40 nm, y fue fácilmente observable la toma en las células, (es decir las células 3T3-D1). Las partículas de 40 nm fueron cargadas en las GP a bajo rendimiento. Solamente unos pocos de las GP en cada muestra contenían los NP. (Estas muestras no se evaluaron para la toma celular)

Las células GP vacías pueden ser tomadas en tubo seguido por agregar la solución salina y las nanopartículas de poliestireno fluorescentes. La incubación, centrifugación y lavado pueden dar como resultado la encapsulación, de las nanopartículas y la remoción de las partículas no unidas. Se puede medir la fluorescencia de las nanopartículas de poliestireno fluorescentes no unidas. Las muestras se pueden resuspender en la solución salina y la fluorescencia de las nanopartículas de poliestireno fluorescentes unidas también se pueden medir. Por lo tanto, la cantidad de nanopartículas de poliestireno fluorescente encapsuladas en las corazas de GP se puede medir.

Estos resultados muestran la prueba del concepto de que partículas de hasta 40 nm, se pueden cargar en las corazas GP mediante numerosas estrategias de atrapado. Estos resultados muestran, en particular, que hasta partículas de 30 nm se pueden cargar muy eficientemente en las corazas GP mediante las estrategias de atrapado descritas aquí.

H. Puntos Cuánticos

Como un segundo experimento de la prueba del concepto, las GP se cargaron con nanopartículas tales como por ejemplo, puntos cuánticos. Los puntos cuánticos son cristales minúsculos de material semiconductor compuesto de varios compuestos de químicos tales como cadmio, zinc, telurio, selenio, y azufre. Los puntos cuánticos son rutinariamente menores de 500 nanómetros de tamaño. Estas nanopartículas reaccionan a la electricidad o la luz al emitir su propia luz a través del rango visible de las longitudes de onda, por ejemplo, de 470 a 730 nm. Las aplicaciones para los puntos cuánticos incluyen ciertas aplicaciones biomédicas, por ejemplo, sensores médicos. Al explotar las propiedades ópticas únicas de los puntos cuánticos, la conjugación de los puntos cuánticos con, por ejemplo, fotosintetizadores, agentes de direccionamiento, y similares, también suministra nanopartículas multifuncionales versátiles tanto para imágenes diagnosticas como aplicaciones terapéuticas. En una experimentación de la prueba del concepto, se cargaron partículas de glucano con puntos cuánticos compuestos de CdSe/ZnS. Los puntos cuánticos particulares tenían una estructura núcleo/coraza CdSe/ZnS un tamaño de aproximadamente 3.5 nm con un tamaño hidrodinámico de aproximadamente 10 nm, $\lambda_{exc} = 580$ nm, $\lambda_{em} = 605$ nm. Los puntos cuánticos se cargaron en las partículas de glucano mediante técnicas de atrapado físico que incluyen la agregación Qpunto y el atrapamiento con ovalbúmina-ARN, sulfato dextrano-quitosan y/o matrices de núcleo de alginato de calcio dentro de las partículas de glucano. Las formulaciones de punto cuántico GP suministran prueba del concepto de carga y suministro celular direccionado al receptor de los puntos cuánticos para aplicaciones de imágenes y suministro de fármaco. La carga y toma de GP-QD (con o sin atrapar alginato) en las células (células 3T3-D1) se visualizó utilizando microscopía fluorescente estándar.

En una experimentación de prueba de concepto adicional, los puntos cuánticos con una carga de superficie se cargaron en las partículas de glucano mediante técnicas de atrapado electrostático que incluye atrapar puntos cuánticos cargados con PEI. Los puntos cuánticos particulares tuvieron una estructura de núcleo/coraza CdSe/ZnS, y fueron carboxilados (Ocean, Nanotech, Springdale, AR). Los NP carboxilados se les permitió el atrapado

electrostático (por vía de PEI) de los NP en las GP. La demostración de la carga de los puntos cuánticos GP y la toma en las células se visualizó utilizando microscopia fluorescente. En una experimentación adicional de la prueba del concepto, los puntos cuánticos se cargaron en la superficie sobre las partículas de glucano mediante técnicas de atrapado de afinidad que incluyen atrapar los puntos cuánticos biotinilados cargados con streptavidina y biotina (o PEI-biotina). La capacidad de los puntos cuánticos biotinilados para unirse a la superficie de las GP biotinilados (y/o los nanonúcleos biotinilados encapsulados de GP) se puede observar microscópicamente. Las corazas de GP se pueden mezclar con cargas tales como el tARN seguido mediante incubación con PEI-biotina para formar nanonúcleos biotinilados. Alternativamente, la matriz de coraza de glucano se puede derivar con biotina para formar corazas de GP-biotina. Las corazas de GP-biotina se pueden sintetizar al tratar las GP con agentes oxidantes tales como periodatos seguido por la formación de base Schiff con aminas tales como la biotina-NH₂, y reducir la base Schiff utilizando agentes reductores tales como borohidrato de sodio. Las corazas de GP-biotina y los nanonúcleos biotinilados de GP se pueden incubar con streptavidina, lavar y luego incubar con puntos cuánticos biotinilados. Luego de lavar la carga de afinidad de los puntos cuánticos biotinilados se pueden visualizar mediante microscopia de fluorescencia. Las formulaciones de nanonúcleo biotinilado-puntos cuánticos biotinilados GP suministran prueba del concepto de la encapsulación mediante atrapado de afinidad y suministro celular direccionado al receptor de los puntos cuánticos para aplicaciones de imágenes y suministro de fármaco. Las formulaciones de puntos cuánticos GP-biotina suministran prueba del concepto de la carga de coraza externa y del suministro celular direccionado al receptor de los puntos cuánticos para aplicaciones de imágenes y suministro de fármacos. La experimentación de la prueba del concepto caracterizó puntos cuánticos con estructura de núcleo/coraza CdSe/ZnS de aproximadamente un tamaño hidrodinámico de 20 nm, biotina derivada (Invitrogen). En las realizaciones de carga de superficie, se utilizó la streptavidina para permitir la unión adicional de los Qpuntos biotinilados a las superficies GP. La visualización de la carga del punto cuántico GP (superficie GP cargada con Qpuntos y Qpuntos encapsulados en GP) y la toma en las células (células RAW264) se hizo por vía de microscopia fluorescente.

I. Nanopartículas Magnéticas

En algunas realizaciones, las YCWP (por ejemplo los YCP o las GP) se pueden cargar con nanopartículas magnéticas. Las partículas magnéticas pueden tener propiedades paramagnéticas o ferromagnéticas.

Para preparar las formulaciones de nanopartícula magnética, YCWP (por ejemplo GP), las GP vacías se pueden tomar en tubo seguido por la carga con nanopartículas magnéticas catiónicas o nanopartículas magnéticas aniónicas (Ferrotec, Bedford, NH). Los tubos se pueden congelar y secar, por ejemplo, mediante liofilización, seguida por el empuje de las nanopartículas en la cavidad GP hueca con un solvente tal como agua. Estas etapas se pueden repetir múltiples veces si es necesario para empujar las partículas magnéticas todo el camino hacia adentro de las corazas de PG. La resuspensión en un solvente tal como etanol, seguido por centrifugación se puede emplear para retirar las nanopartículas no unidas o no encapsuladas. Las etapas de liofilización, empujar con solvente, incubación, suspensión y centrifugación se puedan repetir según sea necesario.

En ciertas realizaciones, se pueden cargar las partículas de glucano con nanopartículas magnéticas tales como por ejemplo, óxidos de hierro. El PEI se puede utilizar para atrapar nanopartículas magnéticas aniónicas. Las nanopartículas magnéticas pueden ser compatibles con tejidos vivos y se pueden utilizar en técnicas diagnósticas y de monitorización tales como radiología e imágenes. En ciertas realizaciones, los óxidos de hierro pueden ser mezclas de Fe₃O₄ y gama-Fe₂O₃. En experimentación de ejemplo, las nanopartículas magnéticas fueron cargadas en las GP. Los ferrofluidos (Ferrotec) de 10 nm de diámetro fueron comprados como suspensiones coloidales estables en agua. Los núcleos de estas partículas fueron hechos de óxido de hierro los cuales son conocidos por ser compatibles con tejidos vivos. De las mediciones con rayos X, los óxidos de hierro se identificaron por ser una mezcla de Fe₃O₄ y gama -Fe₂O₃. Las partículas pueden además comprender un recubrimiento de polímero tensoactivo (catiónico o aniónico) para evitar la agregación. La visualización de las YCWP (por ejemplo las GP) cargados con nanopartículas magnéticas, sus propiedades magnéticas, y su toma en la célula se puede hacer por vía de microscopia de contraste de fase. Las nanopartículas magnéticas aniónicas GP atrapadas con PEI de rodamina fluorescente se visualizaron como lo fue su toma en las células (células 3T3-D1) por vía de microscopía fluorescente, y atracción magnética (visible en micro tubos que contienen las GP-NP cuando se colocan adyacentes a una magneto apropiada). Las formulaciones de nanopartícula magnética GP prueba el concepto de carga y suministro celular direccionado al receptor de las nanopartículas magnéticas para imágenes, purificación celular y aplicaciones de suministro de fármaco.

En algunas realizaciones, las formulaciones de nanopartícula magnética GP se pueden caracterizar al medir su potencial Zeta. Las Figuras 2A, 2B, 3A, y 3B muestran la caracterización de las formulaciones GP de las nanopartículas magnéticas mediante potencial Zeta. La Figura 4 muestra el % de la nanopartícula magnética GP/PEI unida a siARN. Estos resultados muestran que las formulaciones de nanopartículas magnéticas GP se pueden sintetizar para cocargar una carga tal como siARN, ADN y proteínas.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar ferrofluidos comercialmente disponibles de Ferrotec Corporation (Bedford, NH). Un "ferrofluido" es una suspensión estable de partículas magnéticas de tamaño submicrómetro en varios líquidos portadores. Estas partículas se pueden cargar con estabilizadores para evitar la aglomeración. Las

propiedades físicas de los ferrofluidos, tales como la volatilidad, la capacidad ambiental y la viscosidad, etc., son principalmente determinadas por la selección del portador. Cuando se aplica un campo magnético, un ferrofluido adquiere un momento magnético neto debido a la orientación de las partículas en la dirección del campo. Estos fluidos no exhiben remanencia o histéresis. El momento obtenible máximo por volumen unitario es proporcional a la densidad de carga del material magnético y se caracteriza en los productos ferrofluidos como el valor de magnetización de saturación. En saturación, todas las partículas tienen su momento magnético alineado con el campo externo. Por encima de saturación, la magnetización del fluido depende del campo aplicado.

En ciertas realizaciones, las nanopartículas magnéticas pueden ser de 10 nm de diámetro. En varias realizaciones, se pueden utilizar suspensiones coloidales estables en agua. En algunas realizaciones, los núcleos de las partículas se pueden hacer de óxidos de hierro que son conocidos por ser compatibles con tejidos vivos. Los óxidos de hierro se han identificado como una mezcla de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En ciertas realizaciones, se puede utilizar un recubrimiento de polímero tensoactivo (catiónico o aniónico) para evitar la agregación, facilitar la carga de la carga o el atrapado de polímero.

J. Nanopartículas de Oro.

En ciertas realizaciones, las partículas de glucano se pueden cargar con nanopartículas de oro. Partículas de oro NanoXact™ comercialmente disponibles, (San Diego, CA) se pueden utilizar para preparar formulaciones que contienen nanopartículas de oro esféricas de alta calidad que son de aproximadamente 10-100 nm de tamaño. Más preferiblemente, las nanopartículas de oro son de aproximadamente 10-50 nm de tamaño, por ejemplo 10 nm, 20 nm, 30 nm, o 40 nm. Las partículas de oro se pueden suspender, por ejemplo, en agua o una concentración en masa de aproximadamente 0.05 mg/mL de oro. Las nanopartículas de oro se pueden tratar con MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico), por ejemplo, a 0.1 mg/mL de MUA, para formar nanopartículas Au-MUA. La experimentación de ejemplo caracterizó atrapar las nanopartículas de Au-MUA en partículas de glucano utilizando PEI para el atrapado. En algunas realizaciones, las nanopartículas no fluorescentes por ejemplo, nanopartículas de oro puedan reaccionar con reactivos para formar las correspondientes nanopartículas fluorescentes. En ciertas realizaciones, las nanopartículas Au-MUA no fluorescentes pueden reaccionar con PEI fluorescente catiónico para suministrar las correspondientes nanopartículas fluorescentes. En experimentación de ejemplo, se elaboraron NP de Au-MUA (10 nm), atrapados con rodamina-PEI. La visualización de las GP cargados con nanopartículas de oro y su toma en las células fue por vía de microscopía fluorescente. En ciertas realizaciones, la nanopartícula de oro GP-MUA recubierta con PEI puede ser utilizada para unir ácidos nucleicos, tal como siARN. Los NP de Au/MUA (10 nm) fueron hechos utilizando tARN: PEI o atrapado de PEI (solo). La Figura 4 muestra el % del siARN fluorescente de entrada unido a la nanopartícula de oro GP/PEI con o sin las varias metodologías de atrapado.

El atrapamiento de las nanopartículas de Au/MUA con las GP puede ser evaluado utilizando PEI marcado con rodamina (rPEI) a diferentes concentraciones. Un ensayo se puede optimizar al medir y cuantificar la cantidad de r-PEI unido. Se pueden utilizar nanopartículas de oro NanoXact™ de 10, 30, 40, 50, y 100 nm para evaluación. Las nanopartículas de oro se pueden tomar en varios tubos. La solución alcalina diluida de solución MUA se puede agregar a los tubos seguida por la incubación para recubrir las partículas de oro con MUA. La centrifugación seguida por el lavado con solución salina puede retirar el material no unido. Las nanopartículas de oro pueden ser entonces cuidadosamente recuperadas mediante resuspensión en solución salina y agua seguida por centrifugación. La absorción de las nanopartículas de oro recuperadas se puede medir para calcular el porcentaje de recuperación.

Las GP vacías se pueden tomar en tubos y se pueden agregar suspensiones de nanopartículas de oro-MUA. La incubación seguida por congelamiento, secado, por ejemplo, mediante liofilización, y el empujado con agua pueden dar como resultado GP cargados con las nanopartículas de oro-MUA. Las etapas se pueden repetir si es necesario. Una cantidad apropiada de la molécula de atrapado de carga tal como el rPEI se puede agregar. La incubación, centrifugación y lavado se puede retirar del material no unido. Las muestras pueden ser resuspendidas en solución salina y el número de nanopartículas Au-MUA de GP -r-PEI se puede contar utilizando un hematocitómetro. La toma de los Au-MUA-r-PEI de GP en las células tales como las células 3T3-D1 se pueden medir y estudiar el tráfico intracelular. Las formulaciones de partícula de oro GP suministran prueba del concepto de carga y de suministro celular direccionado al receptor de las nanopartículas de oro para imágenes, ablación celular y aplicaciones de suministro de fármaco.

K. Virus asociado a nanopartículas

En algunas realizaciones, las partículas de glucano se pueden cargar con virus tales como por ejemplo, virus asociado a adeno (AAV), o partículas similares a virus (VLPs), o cualquier otro virus pequeño o partícula de virus. La carga de volumen sub-hidrodinámico se puede emplear para cargar el virus en la GP. Una vez dentro de la GP, el virus se puede secuestrar utilizando atrapamiento de heparina por lo cual se forman los complejos de heparina-virus dentro de la cubierta de GP. De acuerdo con una realización de ejemplo, se puede producir un sistema de suministro de nanopartícula de partículas de virus de pared celular de levadura (YCWP-virus NP), que comprende partículas de pared celular de levadura (YCWPs) que comprende nanopartículas virales, en el que se prepara el sistema de suministro de YCWP mediante un procedimiento que comprende las etapas de incubar YCWPs con nanopartículas

de virus (por ejemplo, virus asociado a adeno (AAV), o partículas similares a virus (VLPs), o cualquier otro virus pequeño o partícula de virus) juntos en solución durante un tiempo suficiente para que las NPs entren en las YCWPs (por ejemplo, YGP), por ejemplo, durante aproximadamente 1 a 2 horas, atrapar opcionalmente las nanopartículas de virus en las YCWP utilizando un medio de atrapamiento apropiado, y lavar y/o dispersar el material resultante de tal manera que se prepara el sistema de suministro de YCWP. En realizaciones de ejemplo, el medio de atrapamiento es heparina.

En algunas realizaciones, los viriones de alrededor de 20 a 30 nm (por ejemplo, viriones de AAV de 26 nm que codifican la proteína fluorescente verde (GFP)) se pueden cargar en YCWPs (por ejemplo, YGP). En ciertas realizaciones, se puede utilizar heparina para atrapar (por ejemplo, 1 a 100 mg/ml de heparina). Se pueden preparar diluciones del virus utilizando reguladores tales como PBS. Las soluciones de virus diluidas se pueden agregar a una cantidad apropiada de GP en tubos. Los tubos se pueden incubar durante un tiempo en el cual se pueden hinchar y absorber la solución de virus. Se puede agregar heparina en solución regulada para atrapar el virus encapsulado. Se pueden realizar etapas de incubación, sonicación, centrifugación y resuspensión. Se pueden tomar diferentes cantidades de la solución en, por ejemplo, placas de 96 pocos para evaluar de esta manera la transducción de GFP. Se puede utilizar microscopía de fluorescencia para detectar la fluorescencia de GFP en diferentes intervalos de tiempo para monitorizar y evaluar la eficiencia de transducción.

La experimentación de ejemplo demuestra la carga de AAV2 en partículas de glucano. Las GP se cargan con 10^{14} AAV2-GFP viriones/ml (carga de volumen hidrodinámico) para permitir que las partículas se carguen en GP, seguidas por atrapamiento de heparina (se atrapan los complejos heparina-AAV2 dentro de las GP). La presencia de agregados de heparina-AAV2 dentro de la GP se confirmó mediante visualización microscópica. Las GP elaboradas de acuerdo con esta metodología fueron capaces de suministrar AAV a las células (células 3T3-D1.) Más aún, la GP-AAV fue tan efectiva como el virus libre en la transducción de las células 3T3-D1 para expresar GFP. En presencia de heparina libre, la transducción del virus libre fue > 90% inhibida. AAV2-GFP (56% de transfección), AAV2-GFP + heparina (4% de transfección), GP AAV-GFP/heparina (54% de transfección). La GP AAV también puede ser resistente a anticuerpos de AAV neutralizantes superando potencialmente una limitación importante de la terapia génica de AAV.

V. Métodos de uso

Las nanopartículas se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo, tratamiento de enfermedades, como agentes de diagnóstico para la formación de imágenes, detección y/o seguimiento de condiciones tales como formación de placa, crecimiento del tumor y daño tisular. Se pueden utilizar GP para suministrar las nanopartículas encapsuladas al objetivo apropiado cuando las nanopartículas se pueden liberar para llevar a cabo su función prevista de suministro de fármacos.

Un experto común en la técnica aprecia las aplicaciones de nanopartículas en la formación de imágenes biomédicas. Por ejemplo, las nanopartículas de compuestos que contienen yodo o bario se han utilizado ampliamente como agentes de contraste en formación de imágenes diagnósticas utilizando técnicas de diagnóstico tales como rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), formación de imágenes por ultrasonido y medicina nuclear. Véase el documento US 6,540,981.

Los sistemas son métodos que están disponibles para un experto común en la técnica para utilizar efectivamente nanopartículas como agentes de formación de imagen. Véase, por ejemplo, documento US 7,110,585. Las nanopartículas fluorescentes se han empleado en formación de imágenes térmicas para medir la "radiación Stokes" o "emisión Stokes" caracterizada por bandas de absorción óptica de las nanopartículas. Véase el documento US 7,413,341.

La presente divulgación proporciona un método para la determinación de la temperatura en una o más ubicaciones en una muestra. El método comprende el uso de una muestra que tiene un fluoróforo, tal como, por ejemplo, un colorante fluorescente, nanopartícula fluorescente, o proteína fluorescente, presente en una ubicación que se va a medir térmicamente. El fluoróforo se caracteriza por tener una banda de absorción óptica que, cuando se estimula, resulta en la emisión de un espectro de radiación de fluorescencia, es decir, "la radiación Stokes" o "emisión Stokes".

Se pueden utilizar nanopartículas tales como nanopartículas de poliestireno fluorescentes, nanopartículas magnéticas y nanopartículas de oro para detectar y formar imágenes de tumores. Se pueden utilizar una variedad de técnicas como la espectroscopía de fluorescencia, formación de imágenes por resonancia magnética, espectroscopia Raman de superficie mejorada, ultrasonido, tomografía por emisión de positrones, formación de imagen fotoacústica y formación de imagen de rayos X para detectar la presencia de las nanopartículas y monitorizar el grado en que se propagan dentro del tejido u órgano objetivo.

En ciertas aplicaciones biomédicas, las nanopartículas magnéticas, por ejemplo, aquellas que se encuentran en ferrofluidos, se puede utilizar ya sea directamente o como un componente de uno o más sistemas de la invención, en combinación con una especie biológicamente activa deseada, por ejemplo, carga activa. Las propiedades magnéticas de estas partículas permiten que se separen rápidamente a partir de mezclas líquidas complejas incluso mediante campos magnéticos relativamente débiles. Dependiendo de la naturaleza del sistema, virus, proteínas, y/o células se pueden separar selectivamente. Los agentes terapéuticos se pueden incorporar en o sobre las partículas magnéticamente activas. Las partículas se pueden concentrar por campos magnéticos en los sitios específicos del cuerpo, por ejemplo, donde se suministra alta concentración local de fármaco.

A. Métodos de tratamiento

Las rutas de administración incluyen, pero no se limitan a oral; bucal, sublingual, pulmonar, transdérmica, transmucosal, así como subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, e inyección intramuscular. Las rutas de administración preferidas son oral, pulmonar, intravenosa y transdérmica.

El sistema de suministro de partículas se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. El sistema de suministro de partículas se puede administrar solo o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, un compuesto o composición se puede administrar todo de una vez, como por ejemplo, mediante una inyección de bolo, múltiples veces, tales como por una serie de comprimidos, o se suministran de manera sustancialmente uniforme durante un período de tiempo, como por ejemplo, utilizando una formulación de liberación controlada. También se observa que la dosis del compuesto puede variar con el tiempo. El sistema de suministro de partículas se puede administrar utilizando una formulación de liberación inmediata, una formulación de liberación controlada, o combinaciones de las mismas. El término "liberación controlada" incluye liberación sostenida, liberación retardada, y combinaciones de las mismas.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, empaquetar o comercializar a granel, como una dosis unitaria individual o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se utiliza aquí, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administra a un paciente o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosificación.

Adicionalmente, se puede administrar un sistema de suministro de partículas solo, en combinación con un sistema de suministro de partículas con una carga útil diferente, o con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los otros compuestos farmacéuticamente activos se pueden seleccionar para tratar la misma condición que el sistema de suministro de partículas o una condición diferente.

Otro aspecto de la descripción se relaciona un kit que comprende una composición farmacéutica y material de instrucción. El material de instrucción incluye una publicación, una grabación, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se utiliza para comunicar la utilidad de la composición farmacéutica para uno de los propósitos establecidos aquí en un humano. El material de instrucción también puede, por ejemplo, describir una dosis apropiada de la composición farmacéutica. El material de instrucción del kit puede, por ejemplo, ser fijado a un recipiente que contiene una composición farmacéutica o ser enviado junto con un recipiente que contiene la composición farmacéutica. Alternativamente, el material de instrucción se puede enviar en forma separada del recipiente con la intención de que el material de instrucción y la composición farmacéutica se pueden utilizar cooperativamente por el receptor.

Por ejemplo, un kit puede comprender dos composiciones farmacéuticas separadas que comprenden, respectivamente, una primera composición que comprende un sistema de suministro de partículas y un portador farmacéuticamente aceptable; y la composición que comprende el compuesto segundo farmacéuticamente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. El kit también comprende un recipiente para las composiciones separadas, tal como una botella dividida o un paquete de aluminio dividido. Ejemplos adicionales de recipientes incluyen jeringas, cajas, bolsas, y similares. Normalmente, un kit comprende directrices para la administración de los componentes separados. La forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados preferiblemente se administran en diferentes formas de dosificación (por ejemplo, oral y parenteral), se administran en intervalos de dosificación diferentes, o cuando se desea titulación de los componentes individuales de la combinación por el médico que hace prearcripciones.

Una composición de sistema de suministro de partículas, que comprende, opcionalmente, otros compuestos farmacéuticamente activos, se puede administrar a un paciente ya sea por vía oral, rectal, parenteral, (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea) intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravesical, local (por ejemplo, polvos, pomadas o gotas), o como pulverizador bucal o nasal.

La administración parenteral de una composición farmacéutica incluye cualquier ruta de administración caracterizada por ruptura física de un tejido de un humano y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido. Por lo tanto, la administración parenteral incluye la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra el tejido, y similares. En particular, la administración parenteral incluye inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, o intraesternal y técnicas de infusión intravenosa, intraarterial, o dialíticas renales.

Las formulaciones para administración parenteral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas, y formulaciones biodegradables o de liberación sostenida implantables. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen agentes de suspensión, de estabilización o dispersión. En una realización de una formulación para administración parenteral, se proporciona el ingrediente activo en forma seca (es decir, polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, empaquetar o comercializar en forma de una suspensión o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución se puede formular de acuerdo con la técnica conocida, y puede comprender, además del ingrediente activo, ingredientes adicionales tales como los agentes de dispersión, agentes humectantes, o agentes de suspensión descritos aquí. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y solventes aceptables incluyen solución de Ringer, solución isotónica de cloruro de sodio, y aceites fijos tales como mono- o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como un componente de un sistema de polímero biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implante pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble, o una sal poco soluble.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el sistema de suministro de partículas se mezcla opcionalmente con por lo menos un excipiente inerte (o portador) tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio o (a) rellenos o extensores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, manitol o ácido silícico; (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa o acacia; (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol; (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos o carbonato de sodio; (e) retardantes de solución, como por ejemplo, parafina; (f) aceleradores de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico o monoestearato de glicerol; (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín o bentonita; y/o (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas y comprimidos, las formas de dosificación también pueden comprender agentes reguladores.

Se pueden elaborar composiciones orales, utilizando la tecnología conocida, que libera específicamente los agentes administrados por vía oral en el intestino grueso o delgado de un paciente humano. Por ejemplo, las formulaciones para suministro al sistema gastrointestinal, incluyendo el colon, incluyen sistemas entéricos recubiertos, con base, por ejemplo, en copolímeros de metacrilato tales como poli (ácido metacrílico, metacrilato de metilo), que son solo solubles a pH 6 y mayor, de tal manera que el polímero sólo comienza a disolverse al entrar en el intestino delgado. El sitio donde dichas formulaciones poliméricas se desintegran depende de la velocidad del tránsito intestinal y la cantidad de polímero presente. Por ejemplo, un recubrimiento de polímero relativamente grueso se utiliza para suministro al colon próximo (Hardy et al., 1987 Aliment. Pharmacol. Therap. 1:273-280). También se pueden utilizar polímeros capaces de proporcionar suministro colónico específico a sitio, en el que el polímero se basa en la flora bacteriana del intestino grueso para proporcionar la degradación enzimática de la capa de polímero y por lo tanto la liberación del fármaco. Por ejemplo, se pueden utilizar azopolímeros (Patente Estadounidense No. 4,663,308), glucósidos (Friend et al., 1984, J. Med. Chem. 27:261-268) y una variedad de polisacáridos disponibles de forma natural y modificados (véase solicitud PCT PCT/GB89/00581) en dichas formulaciones.

La tecnología de liberación impulsada tal como aquella descrita en la Patente Estadounidense No. 4,777,049 también se puede utilizar para administrar el sistema de suministro de partículas a una ubicación específica dentro del tracto gastrointestinal. Dichos sistemas permiten el suministro en un tiempo predeterminado y se pueden utilizar para suministrar el sistema de suministro de partículas, opcionalmente junto con otros aditivos que pueden alterar el microambiente local para promover la estabilidad y la absorción, directamente sin depender de las condiciones externas distintas de la presencia de agua para proporcionar liberación in vivo.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires. Además de los compuestos activos, la forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros solventes, solución salina isotónica, agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico,

carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular aceite de almendra, aceite de arachis, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de semillas de sésamo, MIGLYOL™, glicerol, aceites vegetales fraccionados, aceites minerales tales como parafina líquida, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias, y similares. Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, demulcentes, conservantes, reguladores, sales, edulcorantes, aromatizantes, colorantes y agentes perfumantes. Las suspensiones, además del compuesto activo, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes de isoestearilo etoxilados, sorbitol de polioxietileno o ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, grasas comestibles hidrogenadas, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma de acacia, agar-agar, y derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metahidróxido de aluminio, bentonita, o mezclas de estas sustancias, y similares. Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica que son adecuadas para administración oral se pueden preparar, empacar y vender ya sea en forma líquida o en forma de un producto seco destinado a reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso.

Una composición farmacéutica se puede preparar, empacar o comercializar en una formulación adecuada para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dichas composiciones están convenientemente en la forma de polvos secos para administración utilizando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo o utilizando un recipiente de dispensación de solvente/polvo con autopropulsión tal como un dispositivo que comprende el sistema de suministro de partículas en suspensión en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente sólido en polvo fino tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria. Los propulsores de bajo punto de ebullición incluyen generalmente propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición por debajo de 65 grados F. a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir 50 a 99.9% (p/p) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir de 0-1 a 20% (p/p) de la composición. El propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un surfactante aniónico o sólido no iónico líquido o un diluyente sólido (preferiblemente que tiene un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el sistema de suministro de partículas).

Las composiciones farmacéuticas formuladas para suministro pulmonar también pueden proporcionar el ingrediente activo en forma de gotitas de una suspensión. Dichas formulaciones se pueden preparar, empacar o comercializar en forma de suspensiones alcohólicas acuosas o diluidas, opcionalmente estériles, que comprende el sistema de suministro de partículas, y convenientemente se pueden administrar utilizando cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen un agente aromatizante tal como sacarina de sodio, un aceite volátil, un agente regulador, un agente de superficie activa, o un conservante tal como hidroxibenzoato de metilo.

Las formulaciones descritas aquí son útiles para suministro pulmonar también son útiles para suministro intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el sistema de suministro de partículas. Dicha formulación se administra de la manera en que se toma tabaco es decir, mediante inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente con el polvo mantenido cerca de las narinas.

Una composición farmacéutica se puede preparar, empacar o comercializar en una formulación adecuada para administración bucal. Dichas formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas utilizando métodos convencionales, y pueden, por ejemplo, comprender de 0.1 a 20% (p/p) de sistema de suministro de partículas, el equilibrio comprende una composición oralmente soluble o degradable y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos aquí. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo o una solución o suspensión aerosolizada o atomizada que comprende el sistema de suministro de partículas.

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de ciertos compuestos específicos de acuerdo con la presente tecnología. Un experto común en la técnica aprecia que la invención no se limita a los ejemplos de trabajo descritos o a los detalles específicos establecidos en los ejemplos.

Un experto común en la técnica aprecia adicionalmente que las condiciones experimentales representadas en los siguientes ejemplos se pueden variar tanto como 2%, 5%, 10% o 20% por encima o por debajo de la cantidad, temperatura, concentración, pH, tiempo y rpm enumeradas con el fin de optimizar las condiciones para lograr los resultados deseados de los experimentos.

55 EJEMPLOS

Se han utilizado partículas de glucano para el suministro dirigido a macrófagos de un amplio rango de macromoléculas de carga útil (H. Huang, et al., *Infection and Immunity*, vol. 77, pp. 1774-1781, 2009, E. Soto, et al.,

Bioconjugate Chemistry, vol. 19, no. 4, pp. 840-848, 2008, M. Aouadi, et al., Nature, vol. 458, pp. 1180-1184, 2009, G. Tesz, et al., Biochemical Journal, vol. 436, pp. 351-362, 2011, E. Soto, et al., Polymers, vol. 2, pp. 681-689, 2010]. Las cargas útiles solubles se pueden encapsular de manera eficiente dentro de GP mediante los métodos sintéticos Polyplex y Capa por Capa (LBL). Existe un interés cada vez mayor para extender el uso de la tecnología de suministro de GP para moléculas pequeñas de fármaco (es decir productos quimioterapéuticos y antibióticos). Sin embargo, las GP tienen limitaciones en la encapsulación de moléculas pequeñas ya que la mayoría de estas moléculas son de carga neutra y no se pueden atrapar por las técnicas no covalentes utilizadas para ensamblar poliplejos de macromoléculas dentro de las GP. También, los fármacos hidrófobos presentan un desafío para la carga dentro de las GP. La combinación de las tecnologías de encapsulación de nanopartículas y partículas de glucano ofrece una atractiva oportunidad para extender el uso de las GP para el suministro dirigido a macrófagos de fármacos de moléculas pequeñas. Los siguientes ejemplos presentan los resultados de diversos sistemas que utilizan nanopartículas modelo para demostrar los sistemas de suministro de nanopartículas mediados por GP y elaborados por la presente invención.

Ejemplo 1: Capacidad de prueba de Qdots biotinilados para unirse a la superficie YGP y a nanonúcleos biotinilados encapsulados en GP

Se realizaron experimentos para probar la capacidad de los puntos cuánticos de carga (puntos cuánticos CDSE/ZnS) en GP mediante atrapamiento de afinidad o sobre la superficie de la cubierta utilizando interacciones de afinidad de biotina y estreptavidina.

Para preparar núcleos de YGP tARN/PEI-biotina, 1 mg de YGP se mezcló con 6 μL de 10 mg/ml de ARN de levadura (Sigma), y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Después se agregaron 250 μL de PEI biotina al 0.1% y se permitió que las partículas se hincharan durante 30 minutos, luego se sometieron a sonicación y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Las partículas se recolectaron mediante centrifugación, se lavaron tres veces con 500 μL de solución salina al 0.9% y se resuspendieron en 500 μL de PBS. Las partículas se sometieron a sonicación, se contó la cantidad de partículas utilizando un hemocitómetro, una suspensión $1 \times 10^8/\text{mL}$ se preparó en PBS y se almacenó en congelamiento a -20°C .

Para unir los Q-Puntos de estreptavidina a cubiertas de YGP-biotina y núcleos YGP ARN/PEI-biotina en PBS, se agregaron partículas y Qdots como se indica en la Tabla 1.

Para evaluar la carga de Qdot, se formaron imágenes de las partículas utilizando un microscopio de fluorescencia con filtros de rodamina en un aumento de 1000x.

Tabla 1

	1×10^8			μL 1/100	μL
Tubo	YGP	μL	Formulación	Qdots	PBS
1	YGP	100	GP tR/P-B	0	150
2	YGP	100	GP tR/P-B-Qdot	10	140
3	YGP-biotina	100	GP-biotina	0	150
4	YGP-biotina	100	GP-biotina-Qdot	10	140
5	Rodamina-YGP	100	GP-TR	0	150
6		0	Qdot	10	240

Para demostrar el suministro intracelular de formulaciones de YGP-biotina-estreptavidina-Qdot biotinilado las partículas se incubaron con células RAW264 en una relación de partículas: célula 10 durante 2 horas, las células luego se lavaron con PBS y se fijaron en formalina al 0.1% en PBS. Las imágenes microscópicas de fluorescencia mostraron afinidad de superficie de GP-biotina cargada con puntos cuánticos y su absorción por las células RAW264. Las imágenes microscópicas de fluorescencia mostraron afinidad de nanonúcleos biotinilados con GP cargada a través de estreptavidina con Qdots biotinilados encapsuladas y su absorción por células RAW264. Los puntos cuánticos se cargaron efectivamente con afinidad tanto, sobre la superficie, así como dentro de la GP, y se suministraron en células macrófagos RAW264 fagocíticas.

Ejemplo 2: Carga de GP con nanopartículas magnéticas

Se realizaron experimentos para mostrar que las NP magnéticas se pueden cargar en o sobre las GP. Para hacer formulaciones GP cargadas con nanopartículas magnéticas se cargaron tubos que contenían 1 mg o 100 mg de GP vacías con 5 μ L de nanopartículas magnéticas/mg de GP. Se cargaron nanopartículas magnéticas 10 nm catiónicas (EMG 607) o nanopartículas magnéticas 10 nm aniónicas (EMG 707) (Ferrotec, Bedford, NH). Después de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente los tubos se congelaron y se liofilizaron. Se llevó a cabo una reacción de empuje de agua con 5 μ L de agua/mg de GP a temperatura ambiente durante >1 hora. Los tubos se congelaron y se liofilizaron, y los contenidos se resuspenden en etanol al 70% durante 15 minutos. Las nanopartículas libres se separaron de las nanopartículas magnéticas GP mediante centrifugación y se recolectaron los sobrenadantes y se midió la densidad óptica para determinar las nanopartículas magnéticas no encapsuladas. Las etapas de lavado con etanol al 70% se repitieron dos veces y los sedimentos se liofilizaron. Los sedimentos luego se resuspendieron en las cantidades indicadas de polímero de atrapamiento primario (Tabla 2) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se agregó la segunda capa de polímero de atrapamiento, como se indica en la Tabla 2 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las partículas se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron dos veces con 500 μ L de solución salina al 0.9%. Se recolectaron los sobrenadantes y se midió la densidad óptica para determinar cualquier pérdida de nanopartículas magnéticas. El sedimento que contiene las partículas cargadas luego se resuspendió en solución salina al 0.9% y se purificó funcionalmente utilizando un imán. Las imágenes de microscopio mostraron GP vacías frente a GP cargadas con nanopartículas magnéticas y la purificación de las GP magnéticas por un imán. Las GP no magnéticas se eliminaron cuidadosamente mediante aspiración. Las partículas luego se resuspendieron en etanol al 70% para esterilizar durante la noche a -20°C. Luego, las partículas se lavaron aseptícamente en tres muestras en solución salina estéril al 0.9%, se sometieron a sonicación, y se contó el número de partículas utilizando un hemocitómetro, las partículas se diluyeron para preparar una suspensión de 1×10^8 /mL en PBS y se almacenó en congelación a -20°C.

Tabla 2

Tubo	GP	Ferrotec	μ L	Núcleo	μ L	Atrapamiento	mL
	Mg de partículas	NP	NP	Polímero		Polímero	
1	100	EMG 607	500	10 mg/mL de tARN	500	25 k de rPEI al 1%	2
2	100	EMG 607	500	1 mg/mL de Alginato	500	25 k de rPEI al 1%	2
3	100	EMG 707	500	25 k de rPEI al 0.1%	500	solución salina al 0.9%	2
4	100	EMG 707	500	25 k de rPEI al 0.1%	500	25 k de rPEI al 0.1%	2

Para evaluar las partículas de carga de nanopartículas magnéticas se obtuvieron imágenes de microscopio a un aumento de 1000x. Las imágenes de visualización microscópica de fluorescencia mostraron GP cargada con nanopartículas magnéticas aniónicas atrapadas con rodamina PEI (rPEI). Para demostrar el suministro intracelular de nanopartículas magnéticas a YGP se incubaron con células 3T3-D1 en una relación 10 de partícula: células durante 1-24 hrs. Luego, las células se lavaron con PBS y se fijaron en formalina al 0.1% en PBS. Las imágenes de visualización microscópica de fluorescencia mostraron GP cargada con nanopartículas magnéticas aniónicas y su absorción por las células 3T3-D1.

Para caracterizar el potencial zeta de las GP-Mag PN se ensayaron suspensiones utilizando un Malvern DLS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), utilizando métodos recomendados por el fabricante. La Figura 2A muestra la caracterización del potencial zeta de las nanopartículas GP magnéticas aniónicas + formulaciones con o sin PEI. La Figura 2B muestra la caracterización por el potencial Zeta de formulaciones de GP vacías. La Figura 3A muestra la caracterización por el potencial Zeta de nanopartículas magnéticas aniónicas + formulaciones de GP con PEI preparadas utilizando el método de carga optimizada. La Figura 3B muestra la caracterización por el potencial zeta de la muestra de GP magnética con nanopartículas libres utilizando un método de carga sin la etapa de empuje de agua. Para determinar si las formulaciones de complejos NP-PEI GP-aniónicos Mag se pueden unir a siARN fluorescente, formulaciones de GP ARN-PEI de control, GP-aniónico Mag NP y GP-aniónico Mag NP-PEI se incubaron con siARN fluorescente marcado con Cy3 a concentraciones crecientes. Luego de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugaron las partículas y se determinó la cantidad de siARN unido mediante espectroscopia de fluorescencia. La Figura 4 muestra el % de siARN fluorescente unido a GP cargadas con

nanopartículas magnéticas con y sin un recubrimiento de PEI catiónico. Como se demuestra en el presente ejemplo, las diversas nanopartículas magnéticas se cargaron efectivamente dentro de la GP y se suministraron intracelularmente en células capaces de fagocitar partículas de glucano. Más aún, las formulaciones de partículas GP- aniónicas Mag NP-PEI se unieron efectivamente a siARN.

5 **Ejemplo 3:** Atrapamiento de GP de nanopartículas Au/MUA

Las nanopartículas de oro recubiertas con nanopartículas NanoXact™ Gold de Nanocomposix (San Diego, CA) (Tabla 3; 250 uL, 0.02 mg Au/mL) se incubaron con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA, 110 uL de una solución de 0.6 mg/mL). El volumen final se ajustó a 500 uL con NaOH 0.01 M. Las muestras se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Las nanopartículas de oro derivadas de MUA (Au/MUA) se centrifugaron durante 20 min a 10000 rpm. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y los sedimentos se lavaron dos veces con NaCl 1 mM. Los sedimentos lavados se resuspendieron en 250 uL de NaCl 1 mM y se utilizó la medición OD a 525 nm para calcular el % de recuperación de nanopartículas.

Tabla 3

Tubo	Tamaño de Au NP
1	Au 10 nm
2	Au 30 nm
3	Au 40 nm
4	Au 50 nm
5	Au 100 nm

15 Carga GP de nanopartículas Au/MUA -

Las partículas de glucano vacías se mezclaron con nanopartículas de Au/MUA (5 uL de suspensión de nanopartículas/mg de GP) como se indica en la Tabla 4. El sedimento se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras luego de congelaron y liofilizaron. La carga de nanopartícula de Au/MUA se repitió dos veces más. Las muestras se empujaron con agua con 5 ul de agua/mg de GP a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras luego se congelaron y se liofilizaron. Se agregó etanol (70% v/v) (100 uL de etanol/mg de GP) y la muestra se recolectó mediante centrifugación para eliminar las nanopartículas de Au/MUA no encapsuladas. Las muestras de nanopartículas de Au MUA GP sedimentadas se congelaron y liofilizaron. Luego se agregó PEI marcado con rodamina (rPEI) (5 uL de rPEI al 0.01%/mg de GP) para recubrir las nanopartículas de Au/MUA. Las muestras se incubaron durante 20 minutos seguido por adición de 100 uL de rPEI al 0.01%/mg de GP. Se permitió que las muestras se hincharan en el rPEI, las partículas se sometieron a sonicación y se incubaron durante 30 minutos adicionales. Las formulaciones GP-Au/MUA/rPEI se purificaron mediante centrifugación para eliminar el rPEI no unido y las nanopartículas libres. Las muestras luego se lavaron tres veces con solución salina al 0.9% y se evaluaron microscópicamente en un aumento de 1000x para evidencia de formación de núcleo de Au/MUA/rPEI fluorescente dentro de las GP. Las muestras que mostraron evidencia de la formación de núcleo se esterilizaron en etanol al 70% durante la noche de etanol a -20°C. Después de la esterilización, las muestras se lavaron de forma aséptica tres veces en solución salina al 0.9%, se resuspendieron en 1 mL de solución salina al 0.9%, se contaron con un hematocitómetro y la concentración de partículas se diluyó a 1x10+8 partículas/mL. Las formulaciones de GP-Au/MUA/rPEI se probaron para determinar la absorción en células 3T3-D1 y para unión de siARN.

35 Tabla 4

	Au	ul	PEI	uL	uL
Tubo	NP	NP		PEI	PEI
1	Au10/MUA	5	0.01%	5	100

ES 2 614 181 T3

2	Au30/MUA	5	0.01%	5	100
3	Au40/MUA	5	0.01%	5	100
4	Au50/MUA	5	0.01%	5	100
5	Au100/MUA	5	0.01%	5	100
6	solución salina al 0.9%	5	0.01%	5	100
7	Au10/MUA	5	0.10%	5	100
8	Au30/MUA	5	0.10%	5	100
9	Au40/MUA	5	0.10%	5	100
10	Au50/MUA	5	0.10%	5	100
11	Au100/MUM	5	0.10%	5	100
12	solución salina al 0.9%	5	0.10%	5	100
13	Au10/MUA	5	1%	5	100
14	Au30/MUA	5	1%	5	100
15	Au40/MUA	5	1%	5	100
16	Au50/MUA	5	1%	5	100
17	Au100/MUA	5	1%	5	100
18	solución salina al 0.9%	5	1%	5	100
19	Au 10 nm	5	0.01%	5	100
20	Au 10 nm	5	0.10%	5	100
21	Au 10 nm	5	1%	5	100
22	Au 50 nm	5	0.01%	5	100
23	Au 50 nm	5	0.10%	5	100
24	Au 50 nm	5	1%	5	100

5 Las imágenes de visualización microscópica de fluorescencia mostraron GP cargada con nanopartículas de oro-MUA-rPEI y su absorción por células 3T3-D1. La Figura 5 muestra el % de siARN unido a las GP cargadas con tARN-PEI vs. AU-MUA vs. Au-MUAPEI. Las nanopartículas de Au- MUA y Au-MUA-rPEI se cargaron efectivamente dentro de la GP y se suministraron a células fagocíticas. Más aún, las nanopartículas de GP Au-MUA-rPEI se unieron efectivamente a siARN fluorescente.

Ejemplo 4: Carga de GP de AAV2-GFP y transfección de GFP

Se realizaron experimentos para demostrar la carga de virus-2 asociado a adeno (AAV2-GFP) en GP con atrapamiento de heparina para formar complejos de heparina-AAV2 atrapados dentro de GP. Las diluciones de virus AAV2-GFP que contenían 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} equivalentes/mL de genoma se hicieron en PBS. Una uL de cada dilución AAV2-GFP se agregó a 0.2 mg de GP y se le permitió hincharse y absorber el virus durante 2 horas a 4°C. Como se indica en la Tabla se agregaron 5 100 uL de 10 mg/mL de heparina en PBS para atrapar el virus. Los tubos se incubaron durante 1 hr a 4°C. Las muestras para microscopía electrónica se recolectaron mediante centrifugación y el sedimento se congeló y se suministró al Núcleo de Formación de Imagen UMMS. Las muestras se embebieron, fijaron, seccionaron y se formaron imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras para experimentos de transducción de GFP se diluyeron en medio DMEM suero de ternera fetal al +10% y penicilina-estreptomicina al 1% y glutamina al 1%, como se indica en la Tabla 5. Las partículas luego se sometieron a sonicación ligeramente y se agregaron 1, 3.3 o 10 uL de cada formulación a una placa de 96 pozos que contenía 1×10^4 3T3-D1 células/pozo +/- 100 ug/mL de heparina para evaluar la transducción de GFP. Se formaron imágenes de las células a las 48 y 96 horas mediante microscopía de fluorescencia para evaluar la eficacia de transducción de GFP.

15 Tabla 5

Tubo	GP	1 ul de dilución de AAV2-GFP	10 mg/ml de heparina	ul de DMEM
1				1000
2		AAV 2 0.01X		1000
3		AAV 2 0.1X		1000
4		AAV 2 1X		1000
5		AAV 2 0.01X	100	900
6		AAV 2 0.1X	100	900
7		AAV 2 1X	100	900
8	0.2 mg			1000
9	0.2 mg		100	900
10	0.2 mg	AAV 2 0.01X	100	900
11	0.2 mg	AAV 2 0.1X	100	900
12	0.2 mg	AAV 2 1X	100	900

Las imágenes de visualización microscópica de electrones mostraron GP vacías en comparación con las GP cargadas con AAV2-heparina. La presencia de complejos de AAV2-heparina dentro de la cavidad de cubierta de glucano claramente se podría ver a través de la visualización microscópica de electrones. Las imágenes de visualización microscópica de fluorescencia mostraron las células 3T3-D1 transducidas con GFP AAV2 frente a AAV2- GFP+ heparina versus GP AAV2-GFP/heparina y la eficiencia de transducción de GFP de estas formulaciones. Los complejos de heparina-AAV2 se cargaron efectivamente dentro de la GP y podrían transducir eficientemente 3T3-D1 en la presencia de inhibidor de absorción viral, heparina.

Ejemplo 5: Polímeros de atrapamiento que se ligan covalentemente a superficie de GP (TP-GP)

25 La Figura 6A muestra un esquema de ejemplo que describe el acoplamiento covalente de polímeros catiónicos para GP a través de aminación reductora.

Las GP secas se resuspendieron en peryodato de potasio (1 mL de una solución 1 mg/mL/mg de GP). La mezcla se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante por lo menos 8 horas. Luego, la suspensión se centrifugó y se retiró la capa sobrenadante. El sedimento se lavó tres veces con agua para eliminar el peryodato de potasio residual y las partículas se resuspendieron en agua a una concentración de 20 mg/mL. Las alícuotas de 250 uL (5 mg de GP)

se prepararon para el marcado con diferentes polímeros catiónicos. Las muestras de GP oxidadas se trataron con las cantidades de polímero que se indican en la Tabla 6. Las mezclas de reacción se agitaron a temperatura ambiente durante 24 h. Se agregó borohidruro de sodio (30 mg NaBH₄/mg de GP) a cada tubo y la suspensión se agitó durante 24 h. La etapa de reducción de borohidruro de sodio se repitió al agregar una segunda adición de borohidruro de sodio (30 mg/mg de GP) y la agitación se continuó durante 24 h adicionales. La mezcla se centrifugó y se descartó la porción sobrenadante. Las GP modificadas se lavaron 3 veces con agua. Se agregó regulador Tris (2.5 mL) y las muestras se agitaron durante 30 minutos. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con agua, se resuspendieron en 10 mL de etanol al 70%, y se esterizaron durante la noche a -20°C. Las muestras de TP-GP esterilizadas se lavaron asépticamente 3 veces en 10 mL de solución salina al 0.9%. Las muestras se resuspendieron finalmente en 10 mL de solución salina al 0.9%, se contaron con un hematocitómetro y la concentración de partículas se diluyeron a 1x10⁸ partículas/mL. Se evaluaron muestras de GP derivado de polímero de atrapamiento para la unión de nanopartículas de poliestireno fluorescente aniónico (200 nm) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabla 6

Tubo	Concentración		mL
	Polímero	TP (% p/v)	
1	100 k PEI	10	5.27
2	25 k PEI	10	1.4
3	25 k r-PEI	10	1.4
4	25 k f-PEI	10	1.4
5	10 k PEI	1	5.3
6	10 k r-PEI	1	5.3
7	10 k f-PEI	1	5.3
8	2.5 k PEI	1	1.3
9	1.8 k PEI	1	0.95
10	1.2 k PEI	1	0.63
11	0.6 k PEI	1	0.32
15	Quitosano	1	5.27
16	Polilisina (PLL)	1	5.27

15 **Ejemplo 6:** Unión electrostática de nanopartículas de poliestireno fluorescente aniónicas de 200 nm a GP derivado de atrapamiento de polímero

la Figura 7 muestra un esquema de ejemplo que describe la unión no covalente de 200 nm de nanopartículas de poliestireno carboxiladas de rodamina a las GP.

20 Las GP derivadas de polímero de atrapamiento (10 uL de 1x10⁸ partículas/mL) se mezclaron con 10 uL de 1 x 10¹⁰ nanopartículas de poliestireno fluorescente aniónicas y 80 uL de solución salina al 0.9%. Las partículas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y después se centrifugaron a 10.000 rpm durante 3 min. Las muestras se lavaron una vez con solución salina al 0.9% y se recolectaron los sobrenadantes para medir la fluorescencia de nanopartículas de poliestireno no unidas. Los sedimentos que contienen las GP derivadas de polímeros catiónicos de poliestireno se volvieron a suspender en 100 ul de solución salina al 0.9% y se midió la fluorescencia para cuantificar el % de las nanopartículas de poliestireno fluorescentes unidas a las GP derivadas de

25

polímeros catiónicos. Se formaron imágenes de GP derivadas de polímero catiónico de poliestireno 200 nm fluorescente mediante microscopía de fluorescencia para demostrar la unión de 200 nm de nanopartículas aniónicas sobre la superficie GP catiónica. Las GP derivadas de polímero catiónico de poliestireno 200 nm fluorescentes se incubaron con células 3T3-D1 durante 3 horas, las células se fijaron en formalina al 0.1% y se formó imagen mediante microscopía fluorescente. Las imágenes microscópicas de visualización de fluorescencia ilustran la localización en la superficie de la GP de GP derivadas de polímero catiónico incubadas con nanopartículas de poliestireno 200 nm fluorescentes, y su absorción por células 3T3-D1. Las imágenes de visualización microscópica de fluorescencia mostraron GP no derivadas con nanopartículas de poliestireno 200 nm fluorescentes que ilustran la ausencia de unión de las nanopartículas de poliestireno a la superficie de GP. La Figura 7 muestra el % de unión de nanopartículas de poliestireno carboxiladas con rodamina a las GP derivadas de la superficie de polímero catiónico. La unión de partículas de poliestireno 200 nm a TP-GP (el eje y representa el % de NP de diferente tamaño en el sedimento después de separación de amortiguamiento de sacarosa de sedimentos del sobrenadante. La experimentación presente demostró que las nanopartículas de poliestireno fluorescentes de diferentes tamaños demasiado grandes para entrar en la cavidad de GP hueca se cargaron efectivamente sobre la superficie de la GP y se suministraron en células

Ejemplo 7: Partículas de glucano cargadas con nanopartículas poliméricas derivadas

Se utilizaron nanopartículas de poliestireno de carboxilato marcadas con rodamina (cPS-nanopartículas) como un sistema modelo debido a su distribución de tamaño estrechamente uniforme, alta señal fluorescente, y la capacidad para entrecruzar o unir nanopartículas de carboxilato a la superficie de las GP modificadas con cationes a través de interacciones electrostáticas. Las cPS-NP (20 nm de diámetro) se utilizaron para preparar núcleos de nanopartículas encapsuladas dentro de la cavidad hueca de GP. Los ciclos de congelación-descongelación durante el proceso de carga de nanopartículas provocaron la agregación de nanopartículas que atrapan las cPS-PN dentro de las GP. Adicionalmente, la inclusión de un polímero catiónico, como polietilenoimina (PEI) o quitosano entrecruzan electrostáticamente las nanopartículas agregadas dentro de las GP y ralentizó su liberación. La Figura 8 muestra imágenes microscópicas de núcleos de nanopartículas de GP y absorción dirigida al receptor por las células que tienen receptores de glucano. Se cargaron cPS-PN a una concentración de 2.25×10^{13} nanopartículas/mg de GP y la medición de las cPS-PN no unidas recolectadas del lavado de núcleos de GP-cPS NP demostró que la eficiencia de encapsulación de nanopartículas fue superior al 80%. La alta capacidad de encapsulación de cPS-NP en la cavidad hueca en GP resulta en la carga de > 30.000 , 20 nm de cPS-NP por partícula de glucano. Sin embargo, existe un límite para el tamaño de las nanopartículas que se pueden encapsular dentro de las GP porque el tamaño de poro promedio en la cubierta de las GP es de menos de 40 nm. Para superar esta limitación de tamaño se concibió un método alternativo para unir las nanopartículas a la cubierta GP externa.

Las GP catiónicas se sintetizaron mediante funcionalización de la superficie de GP con peso molecular diferente, PEI ramificados. La colección de PEI-GP catiónics se preparó mediante aminación reductora de partículas de glucano oxidadas con PEI siguiendo procedimientos similares reportados para otros polisacáridos (T. Azzam, et al., J. Medicinal Chemistry, vol. 45, pp. 1817-1824, 2002). Los 1,3-glicosídicos son estables a la oxidación, por lo tanto la oxidación de las partículas de glucano se lleva a cabo sólo en los monómeros de glucosa de reducción terminales (<2%) en la estructura de β -glucano de las partículas. Esto limita el injerto de PEI a ~ 0.12 μmol PEI/mg de GP. El rendimiento de la oxidación con peryodato de la glucosa terminal en las partículas ($60 \pm 10\%$) se determinó utilizando un ensayo de clorhidrato de hidroxilamina. Esta etapa de oxidación limita la reacción de los PEI catiónico mediante aminación reductora a menos de 0.07 μmol

PEI/mg de GP. La unión de los polímeros catiónicos a las partículas de glucano se confirmó por una prueba de ninhidrina. Los resultados de injerto de PEI se muestran en la Tabla 1 confirman que los niveles de PEI- ligado covalentemente a las GP variaron desde 0.01 hasta 0.03 μmol de PEI/mg de GP (15-40% de rendimiento con base en un injerto de PEI máximo de 0.07 μmol de PEI/mg de GP). El peso molecular de PEI no parece tener un efecto sobre el injerto, por lo tanto es probable que la accesibilidad de las unidades de glucosa oxidadas en la superficie de la partícula sea el parámetro de control en la reacción.

Los resultados de potencial Zeta (Tabla 7) confirmaron la síntesis de las GP catiónicas. El potencial zeta se ha utilizado anteriormente para seguir las secuencias de reacción sobre nano y micropartículas (F. Thielbeer, et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 22, no. 2, pp. 144-150, 2011]. Las GP no modificadas son neutrales y un cambio significativo a un potencial positivo demostró unión de PEI a GP. Una limitación de las mediciones de potencial zeta es el efecto de agregación de partículas sobre el potencial zeta para establecer una relación cuantitativa entre el número de grupos superficiales y los valores del potencial zeta. Los resultados de potencial zeta de muestras de PEI -GP indican que se ha injertado suficiente PEI en la superficie GP para cambiar el potencial zeta de GP neutras a ~ 20 mV (PEI de bajo peso molecular) o ~ 30 mV (PEI de alto peso molecular).

Tabla 7

Muestra GP	Resultados de funcionalización de superficie de PEI $\mu\text{mol PEI/mg de GP}$	Pico de potencial zeta ($\pm 5 \text{ mV}$)
GP	--	2.4
1.2 k de PEI-GP	0.012 ± 0.002	22.1
1.8 k de PEI-GP	0.031 ± 0.021	21.7
10k de PEI-GP	0.015 ± 0.001	21.1
25k de PEI-GP	0.0136 ± 0.003	30.2
100 k de PEI-GP	0.0192 ± 0.001	33.3

Se utilizaron nanopartículas de poliestireno de carboxilato aniónicas fluorescentes (cPS-nanopartículas) de tres diámetros (20, 100 y 200 nm) para medir la capacidad de unión de las PEI-GP y las GP de control. Las nanopartículas más grandes (0.5, 1, y 2 μm) también se evaluaron, pero el análisis cuantitativo fue difícil debido a agregación espontánea de cPS-NP con las GP. Las muestras de GP cargadas con cPS-NP preparadas con nanopartículas de 200 nm o menos de diámetro se pueden separar de las GP mediante centrifugación. La cantidad de cPS-PNs unidas a las GP se midió a partir de la fluorescencia de cPS-PN no unidas recolectadas en el sobrenadante y las nanopartículas unidas en las fracciones de sedimentos de NP-GP. La capacidad de unión se define como la relación de las mediciones de emisión de fluorescencia de cPS-NP en la fracción de sedimento dividido por la entrada de cPS-NP. Fluorescencia de cPS-NP medida en sedimento/entrada = capacidad de unión

La Figura 7 muestra que las PEI-GP se unen fácilmente cPS-PNs. La capacidad de unión de la PEI-GP para las nanopartículas de poliestireno fluorescentes aniónicas se llevó a cabo en una relación de 100: 1 de cPS-PNs: partículas glucano con un rango de 50-90%. El control GP no modificado tenía unión de cPS-NP mínima. El contenido de aminas/GP aumenta con el peso molecular de PEI, sin embargo no existe una correlación entre el contenido de amina (carga superficial) y la capacidad de unión que indica que en la relación cPS-NP/GP utilizada en los datos presentados en la Figura 7 muestra que la unión está limitada por la concentración de nanopartículas. A menor relación cPS-NP/GP (10: 1 o 1: 1) la eficiencia de unión es mayor de 95%. No fue posible medir la unión en relaciones de cPS-NP/GP superiores a 100: 1 debido a la separación ineficiente del exceso de cPS-NP no unidas de los sedimentos de GP.

Se evaluaron muestras de cPS-NP-PEI-GP para la estabilidad de unión de nanopartículas a pH 5 y pH 7 en reguladores que contienen suero bovino fetal al 10% (FBS) para simular las condiciones de absorción celular. Las medidas de fluorescencia de las nanopartículas en solución y la evaluación microscópica de las muestras después de 48 h de incubación mostró que más del 60% de las nanopartículas aniónicas permanecen unidas a las partículas de PEI-GP modificadas (Figura 7B). La estabilidad de la unión electrostática de cPS-NP a PEI-GP proporciona absorción mediada por glucano eficiente de las cPS-NP-PEI-GP en células que expresan receptores de glucano (Figura 10e y 10f).

También se utilizó el potencial zeta para demostrar la unión de las cPS-Nos aniónicas a las PEI-GP catiónicas. Los datos de potencial zeta de la Figura 9 muestran la unión de cPS-NP a las GP catiónicas ya que el potencial zeta de las GP catiónicas cambia a un valor aniónico (-25 mV). Adicionalmente, la separación efectiva de las cPS-PNs no unidas de la muestra de cPS-NP-GP es clara ya que sólo existe un pico (cPS-NP-GP) y no hay evidencia de cPS-PNs no unidas a $\sim -50 \text{ mV}$. En contraste, el potencial zeta de las GP de control no modificadas no cambió significativamente después de incubación con 200 nm de cPS-NP.

La evaluación microscópica (Figura 10A, 10B) de estas muestras confirmó la unión de las nanopartículas fluorescentes a la superficie de PEI-GP con la fluorescencia de cPS-NP ubicada alrededor del perímetro de las cubiertas de GP. Las GP no modificadas de control no mostraron cPS-PNs fluorescentes que establecen las GP. La citometría de flujo se utilizó para cuantificar la unión de cPS-PNs fluorescentes a GP no modificada y PEI-GP. Los resultados, que se muestran en la Figura 10C, 10D, confirmaron que las cPS-NP fluorescentes se unen a las GP modificadas con PEI. Aunque la cantidad de nanopartículas de 200 nm que se pueden unir a la superficie de las GP modificadas ($\sim 70 \text{ cPS-NP/GP}$) es significativamente menor que la cantidad de partículas de 20 nm de que pueden atrapar en el interior de GP ($> 30.000 \text{ cPS-NP/GP}$ de 20 nm), estas dos estrategias de formulación NP permite el uso de GP para el suministro de fármacos dirigida de conjugados de fármaco a nanopartículas en un amplio rango de tamaños de NP y químicas de superficie. La Figura 10E-10F muestra una absorción NIH3T3-D1 de nanopartículas cPS-NP unidas a 25 k PEI-GP. Estos experimentos de absorción de partículas demuestran que las

cPS-NP unidas electrostáticamente a PEI-GP se suministraron de manera más eficiente a las células fagocíticas que las nanopartículas de cPS-NP incubadas con las partículas GP de control o nanopartículas libres de cPS. Adicionalmente, los experimentos de absorción celular que utilizan muestras de cPS-NP-PEI-GP confirmaron los resultados de estabilidad (Figura 7b) de las muestras unidas electrostáticamente y que el bajo nivel de modificación superficial de PEI de GP, o la unión de nanopartículas aniónicas a la superficie PEI-GP no tuvo un impacto evidente sobre la fagocitosis mediada por glucano o toxicidad celular.

Ejemplo 8: Uso de partículas de glucano para el suministro de nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con doxorubicina.

Se han utilizado muchos tipos de nanopartículas para el suministro de fármacos y la formación de imágenes (es decir, nanopartículas de sílice, nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, nanogeles poliméricos, nanopartículas de óxido de hierro magnético, puntos cuánticos, nanopartículas PLGA (S. S. Suri, et al., *J. Occupational Med. and Toxicol.*, vol. 2, pp. 1-6, 2007, R. A. Petros, et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, pp. 615-627, 2010, Y. Malam, et al., *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 7, pp. 1067-1078, 2011]). El fármaco se puede atrapar físicamente dentro de las nanopartículas, o unir químicamente a la superficie de las nanopartículas. También se han desarrollado métodos para controlar con precisión el tamaño de las partículas. Las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) fueron elegidas como un sistema modelo con las GP debido a su facilidad de síntesis y capacidad para atrapar los fármacos quimioterapéuticos (es decir, doxorubicina). Una muestra de MSN que contiene tetraetoxisilicato (TEOS), amino-propiltriethoxisilano (APTS), y 3- metilfosfonato trihidroxisililpropilo se sintetizó siguiendo el procedimiento reportado por Tamanoi (J. Lu, et al., *Small*, vol. 3, no. 8, pp. 1341-1346, 2007, J. Lu, et al., *Nanobiotechnology*, vol. 3, pp. 89-95, 2007). El MSN se sintetizó por un método de co-condensación y el compuesto de fosfato se seleccionó por tener una cadena de alquilo más grande que APTS para proporcionar una partícula con grupos de superficie más externa que corresponden a fosfato aniónico. Esto evita la agregación de las MSN de enlaces de hidrógeno entre partículas entre los grupos silanol superficiales y grupos amina. La síntesis exitosa de esta muestra de MSN se confirmó mediante potencial zeta (-31.1 ± 5 mV) y mediciones del tamaño de partícula de DLS (tamaño promedio de MSN de 120 nm, índice de polidispersidad PDI de 0.4). La distribución del tamaño de partícula amplia y partícula de gran tamaño impidieron el uso de MSN para cargar dentro de GP. Sin embargo, la muestra contenía grupos de fosfato aniónicos para unión electrostática a la superficie de PEI-GP catiónicas.

La MSN se cargó con doxorubicina quimioterapéutica (Dox), un fármaco anti-tumor del tipo antraciclina que ejerce su actividad antiproliferativa a través de intercalación de ADN e inhibición de la síntesis de ADN que conduce a muerte celular (G. Bonadonna, et al., *Cancer Research*, vol. 30, no. 10, pp. 2572-2582, 1970, N. P. Niraula, et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 87, pp. 1187-1194, 2010). Las limitaciones en el uso de Dox como agente antitumoral incluyen cardiotoxicidad crónica o aguda. Se ha estudiado el Dox utilizando diferentes sistemas de liberación de nanopartículas para mejorar el suministro de Dox, minimizar la dosificación y reducir la toxicidad que conduce al desarrollo exitoso de una formulación Dox liposomal (Doxil).

El Dox se cargó en las MSN en DMSO a concentraciones objetivo que varían 0-2 μ moles de Dox/mg de MSN. Después de cargar Dox MSN, las muestras de Dox-MSN se lavaron para eliminar Dox no unido. La cantidad de Dox cargada en las muestras de MSN se cuantificó al medir la fluorescencia Dox extraída en metanol y los resultados mostraron que la unión de Dox a MSN era 0.06 μ mol de Dox/mg de MSN, que representa 3% de la carga de entrada. Esta unión es \sim 5 veces mayor que la unión Dox a una muestra MSN de control sin grupos fosfatos. Otros grupos han reportado capacidades de unión Dox similares con MSNs funcionalizadas con fosfonato (6-8% p/p) y han mostrado mayor unión a estas MSNs funcionalizadas en comparación con los controles (H. Meng, et al., *ACS Nano*, vol. 4, no. 8, pp. 4539-4550, 2010). Las muestras Dox-MSN eran estables en PBS (pH 7) lo que permite la unión electrostática de Dox-MSN aniónica a la superficie de PEI-GP catiónicas. Esta reacción de unión se monitorizó mediante un ensayo de unión de fluorescencia (Figura 12), potencial zeta (Figura 13) y se confirmó mediante microscopía de fluorescencia (Figura 13, recuadro). El ensayo de unión de fluorescencia mostró unión eficiente y selectiva de Dox-MSN a PEI-GP a bajas concentraciones de Dox-MSN. Las concentraciones más altas mostraron una reducción en la eficacia de unión probablemente debido a la saturación de PEI disponibles para la unión de Dox-MSN. El nivel de unión de fondo de las nanopartículas de Dox-MSN a las GP no modificadas corresponde a la fracción de nanopartículas que no se separaron de manera eficiente de las partículas de glucano. Esto se ve en la Figura 11, tanto la Dox-MSN sola y Dox-MSN con GP mostraron unión similar como resultado de medir la fluorescencia de nanopartículas libres de Dox-MSN en la fracción de sedimento. Las muestras de Dox-MSN-PEI-GP se incubaron en solución salina al 0.9%, PBS con suero bovino fetal al 10% (FBS), y regulador de acetato de sodio (pH 5) a 37°C durante 24 h y se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia para confirmar la estabilidad de unión de Dox-MSN a PEI-GP.

Las mediciones de potencial zeta confirmaron la unión selectiva de Dox-MSN a PEI-GP (Figura 12). La Dox-MSN tenía un potencial zeta negativo que corresponde a los grupos de fosfato externos de MSN. La unión de Dox-MSN aniónica a la PEI-GP catiónica cambió el potencial zeta de la muestra de PEI-GP de un valor positivo a negativo. En comparación, el cambio de potencial zeta de la muestra GP es mínimo confirmando que la Dox-MSN no se une a las

GP no modificadas. La microscopía de fluorescencia confirmó que la Dox-MSN se une a PEI-GP catiónica pero no a GP.

Las muestras de Dox-MSN-GP y Dox-MSN-PEI-GP se probaron para el suministro de Dox intracelular, y actividades anti-proliferativa y citotóxicas en la estirpe celular NIH 3T3-D1. Esta estirpe celular se ha modificado genéticamente para expresar el receptor glucano Dectin-1 y fagocita de manera eficiente las GP. La Figura 13 muestra que la Dox-MSN-PEI-GP suministrarán más eficientemente Dox en células NIH3T3-D1 que la Dox-MSN-GP o Dox-MSN después de incubación de 3 horas.

Las células se incubaron con concentraciones variables de Dox-MSN-PEI-GP, Dox-MSN-GP, Dox-MSN libre, o Dox libre para evaluar las actividades anti-proliferativas y citotóxicas durante 48 horas de incubación. Los materiales no incorporados se lavaron después de 3 horas de incubación, un período de tiempo suficiente para absorción de GP eficiente por las células NIH 3T3-D1, y se siguieron el crecimiento y la viabilidad de las células. Las altas concentraciones de DOX libre o Dox-MSN ($> 2.5 \mu\text{g}$ de Dox-MSN que contiene $\sim 0.15 \text{ nmol}$ de Dox) inhibió el crecimiento celular ($> 60\%$). Como se ve en la Figura 14 a una concentración de 0.015 nmol de Dox las muestras de Dox-MSN-PEI-GP mostraron efecto similar como el DOX libre, pero las muestras de Dox-MSN libre o Dox-MSN-GP mostraron menos inhibición de crecimiento. Por debajo de la Concentración Inhibidora Mínima (MIC) de DOX libre (0.0015 nmol de Dox) aún existe una inhibición del crecimiento significativa ($20\text{-}30\%$) mediante la formulación Dox-MSN-PEI-GP (Figura 14) que muestra el aumento de la eficacia del suministro dirigido a GP de Dox-MSN-PEI-GP. Otros grupos han reportado el uso de MSN para el suministro de otros productos quimioterapéuticos (es decir, camptotecina) y mostraron una reducción de 10 veces en la concentración de fármaco en comparación con el fármaco libre para lograr 50% de muerte celular (J. Lu, et al., Small, vol. 3, no. 8, pp. 1341-1346, 2007, J. Lu, et al., Nanobiotechnology, vol. 3, pp. 89-95, 2007). El uso de PEI-GP para el suministro de Dox-MSN permite una reducción en la dosis de fármaco en comparación con DOX libre o Dox-MSN que demuestra la ventaja del suministro dirigido a GP. El trabajo futuro se centrará en la optimización de incorporación de Dox a las nanopartículas y la liberación controlada de Dox desde MSN y otras nanopartículas (es decir, las nanopartículas de oro) para mejorar la citotoxicidad de las formulaciones de Dox NP-GP. Estas formulaciones se evaluarán en la división de células tumorales (es decir, NIH 3T3-D1) y no división de macrófagos primarios, y en ensayos de células de macrófagos-tumor co-cultivo para probar la hipótesis de que los macrófagos pueden actuar como portadores basados en células de formulaciones de GP-Dox NP-GP en tumores. Las formulaciones óptimas de GP-Dox NP-GP se probarán in vivo para el suministro de Dox macrófagos dirigidos y la acumulación en tumores.

30 **Discusión: Ejemplos 7 y 8**

Se han desarrollado dos estrategias para el suministro dirigido de nanopartículas en las células inmunitarias innatas fagocíticas. Las nanopartículas de menos de 30 nm de diámetro se encapsularon dentro de la cavidad hueca de las GP (~ 36.000 de NP/GP para 20 nm de NPS). Las nanopartículas aniónicas más grandes ($> 100 \text{ nm}$) se unieron electrostáticamente a la superficie de las GP derivadas con el polímero catiónico PEI lo que permite el suministro de ~ 70 NP/GP. Las nanopartículas de sílice mesoporosas (120 nm) que contienen doxorubicina se unieron electrostáticamente a PEI-GP proporcionando el suministro dirigido de los Dox-MSN-PEI-GP a células capaces de fagocitar partículas de glucano. En los niveles Dox inferiores una concentración de fármaco libre efectiva en una cantidad equivalente de Dox-MSN-PEI-GP suministra efectivamente suficiente Dox para inhibir el crecimiento de la estirpe celular GP-fagocítica NIH 3T3-D1. Estos resultados demuestran que el sistema de suministro de NP-GP ofrece el potencial del suministro dirigido a macrófagos mediado por GP de múltiples nanopartículas en un solo evento de absorción que proporciona alta eficiencia de suministro de fármacos intracelular. Se considera que los macrófagos pueden servir como "caballos de Troya" que llevan y liberan el fármaco en tumores sólidos y pueden mejorar adicionalmente el efecto anti-tumor de Dox-MSN-PEI-GP in vivo. Es posible que una variedad de formulaciones de nanopartículas cargadas con fármaco puedan proporcionar ventajas de mayor capacidad de unión de fármacos y la posibilidad de liberación controlada. Adicionalmente, el uso de ciertos tipos de nanopartículas (es decir, nanopartículas de oro, óxido de hierro magnético) puede agregar propiedades terapéuticas al sistema de suministro de NP-GP.

Ejemplo 9: Purificación de células con muestras de GP magnéticas

Los receptores de NIH3T3 y dectin-1 que expresan estirpes celulares 3T3-D1 se colocaron en placas de 6 pozos para obtener una densidad celular de 5×10^5 células/pozo en el día del experimento. Las suspensiones de partículas (partículas de glucano magnéticas marcadas con fluorescencia (GP) y GP no magnéticas marcadas con fluorescencia) a una concentración de 1×10^8 partículas/mL se resuspendieron mediante sonicación de las partículas individuales. $50 \mu\text{L}$ de la suspensión de partículas se agregó a las células (relación de partícula a célula $10:1$) y las muestras se incubaron durante la noche a 37°C . El medio se retiró y las células se lavaron una vez con PBS estéril. El PBS se retiró cuidadosamente y se agregó 1 mL de PBS con $50 \mu\text{L}$ de EDTA tripsina a cada pozo. Las células se incubaron con tripsina-EDTA durante 2-3 minutos para separar las células de la placa y las células suspendidas se transfirieron a tubos Eppendorf. Las células se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm , se eliminó el líquido y las muestras se resuspendieron en $500 \mu\text{L}$ de regulador de columna (PBS, $\text{pH } 7.2$ que contiene BSA al 0.5% y EDTA 2 mM). Las muestras se transfirieron a columnas de purificación magnéticas (columnas de separación

MACS, Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA) y se recolectó el regulador de flujo continuo que contiene células sin partículas magnéticas. Las columnas se lavaron tres veces con el regulador de columna para eliminar cualquier célula sin partículas magnéticas. Las columnas se retiraron del imán para liberar las células que contienen partículas magnéticas y estas células se recolectaron al lavar la columna tres veces con la solución reguladora. Tanto las fracciones unidas como no unidas se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm, el solvente se eliminó cuidadosamente y las células se resuspendieron en 1 mL de regulador. Las muestras de 10 μL se mezclaron con 10 μL de azul de tripano al 0.2% y las células se evaluaron para viabilidad y se contaron utilizando un hematocitómetro. La Figura 15 representa el % de células adheridas a la columna magnética. Se tomaron de forma muy eficiente FGP-mag-PN por el receptor de glucano que expresa células 3T3-D1 y sirve como un medio efectivo para purificar las células a través de separación magnética.

Los Materiales y Métodos utilizados a través de los Ejemplos, en particular, en los Ejemplos 7 a 8 son como sigue. Dichos Materiales y Métodos detallados son de ejemplo y no pretenden ser limitantes.

1. 1. Materiales. Nanopartículas fluorescentes de color rojo modificadas con carboxilato y azul Alamar se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA); las partículas de glucano (GP) se prepararon de levadura de Baker (levadura de Baker Fleishmans, AB Mauri Food Inc, Chesterfield MO) de acuerdo con un procedimiento publicado previamente (E. Soto, et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 19, no. 4, pp. 840-848, 2008). Las polietileniminas (PEI, de peso molecular de 1.2, 10 y 100 kDa) se adquirieron de Polysciences (Warrington, PA). Todas las otras PEI, productos químicos para la síntesis de las MSN, y solventes se adquirieron de Sigma Aldrich (Allentown, PA) y se utilizaron como se recibieron. Los materiales para experimentos de cultivo de tejidos celulares se adquirieron de Gibco Scientific (Grand Island, NY) o Fisher Scientific (Fairlawn, NJ).

1.2. Reparación de núcleos de nanopartículas de 20 nm dentro de GP. Se utilizaron nanopartículas de 20 nm fluorescentes a una concentración de 4.5×10^{15} partículas/mL. Las partículas de glucano secas se mezclaron con 5 μL de suspensión de nanopartículas/mg de GP para obtener una pasta uniforme, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, y se liofilizó la formulación cargada con GP-NP. Este procedimiento de hidratación- carga-liofilización se repitió utilizando agua (5 μL /mg de GP) para empujar hidráulicamente las nanopartículas en GP mediante acción capilar. Las GP-PNs secas se hidrataron y se lavaron después de la segunda liofilización para eliminar las nanopartículas libres, se esterilizaron en etanol al 70% a -20°C , se lavaron de manera aséptica tres veces con solución salina al 0.9%, se resuspendieron en solución salina al 0.9%, se contaron con un hematocitómetro, y la concentración GP se ajustó a una concentración de 1×10^8 partículas/mL. Las muestras se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, potencial zeta, y para absorción mediada por GP en células fagocíticas.

1.3. Síntesis de GP catiónicas. Las GP (5 mg) se resuspendieron en 10 mLs de agua mediante homogeneización. Se agregó peryodato de potasio (0.4 mL de una solución de 1 mg/mL) y la mezcla se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante por lo menos seis horas. Las muestras de GP oxidadas se lavaron tres veces con agua, y se utilizaron inmediatamente para síntesis de aminación reductora. Se agregaron polímeros catiónicos (PEIs) y agua a las muestras oxidadas de GP (1 μmol de PEI/mg de GP) y las partículas se resuspendieron y se mezclaron a temperatura ambiente durante la noche. Las muestras aminadas se redujeron con borohidruro de sodio (0.1 g) y se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas. Las muestras reducidas se lavaron con agua. Se agregó regulador Tris (5 mLs, pH 7.5, 0.05 M) y la muestra se incubó durante 30 minutos. Las muestras se lavaron con agua, se resuspendieron en etanol al 70% y se almacenaron durante la noche a -20°C para la esterilización, después se lavaron de forma aséptica tres veces con solución salina al 0.9%, se resuspendieron en solución salina al 0.9%, las partículas se contaron con un hematocitómetro y las suspensiones de partículas se diluyeron a una concentración de 1×10^8 partículas/mL y se almacenaron a -20°C . Las partículas de glucano oxidadas con peryodato ($n = 5$ muestras) se evaluaron para contenido de aldehído utilizando un ensayo de clorhidrato de hidroxilamina (H. Zhao, et al., Pharmaceutical Research, vol. 8, pp. 400-402, 1991.). Las muestras de GP oxidadas (5 mg) se incubaron en 1 mL de DMSO a 50°C durante 2 h para disolver las partículas. Las muestras se centrifugaron para eliminar el material insoluble (quitina). Se agregó solución de clorhidrato de hidroxilamina (0.5 mL, 0.5 N) que contenía naranja de metilo al 0,05% p/v para las muestras y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas. Las muestras se titularon con una solución de hidróxido de sodio 0.01 M normalizada hasta que se alcanzó un punto final rojo a amarillo. El nivel de acoplamiento de PEI en las muestras de PEI-GP se midió con un ensayo de ninhidrina. Las muestras de PEI-GP (1 mg) se resuspendieron en 100 μL de agua y se mezclaron con 100 μL de ninhidrina al 2% p/v en DMSO. Las muestras se calentaron a 100°C durante 20 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 800 μL de etanol. Las muestras de PEI de diferentes concentraciones también se trataron con ninhidrina para preparar curvas de calibración y determinar el rango de respuesta lineal de cada uno de los PEI utilizados en la modificación química de las GP. Se midió la absorbancia a 570 nm para los controles de curva de calibración, las muestras de PEI-GP y controles GP blanco. Un total de tres muestras de cada PEI-GP se analizaron con el ensayo de ninhidrina.

1.4. Unión de nanopartículas a GP derivados de superficie. Las muestras de GP o PEI-GP (10 μL 1×10^8 partículas/mL), y nanopartículas carboxiladas marcadas con rodamina de diferente diámetro (20, 100 y 200 nm) se mezclaron en relaciones de NP/GP de 1/1, 10/1 y 100/1 en un volumen final de 100 μL en solución salina al 0.9%.

Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 1 hora y las nanopartículas no unidas separadas de las GP que contienen nanopartículas unidas mediante centrifugación (10000 rpm durante 2 min). Luego las muestras se lavaron con solución salina al 0.9% (100 μ L) para eliminar las nanopartículas no unidas del sedimento, las muestras de sedimento lavadas se resuspendieron en solución salina al 0.9% (100 μ L) y la fluorescencia de las nanopartículas de poliestireno (excitación = 580 nm, emisión = 605 nm) se midieron en todas las fracciones para cuantificar las nanopartículas unidas y no unidas. El promedio de por lo menos cinco mediciones se recolectó para cada condición experimental. Las muestras NP-GP también se evaluaron mediante mediciones de potencial zeta, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Se evaluaron las muestras de NP-GP para estabilidad de unión de nanopartícula a las GP mediante incubación en solución salina de regulador fosfato (PBS, pH 7) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), o regulador de acetato de sodio (0.1 M, pH 5) durante 48 horas. Las muestras se procesaron mediante centrifugación para eliminar las nanopartículas libres, se lavaron y las fracciones de sobrenadante se analizaron para cPS-PNs liberado, y las fracciones sedimentadas se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia para evaluar la unión de cPS-PN a GP.

1.5. Nanopartículas de Sílice Mesoporosa (MSN). Las muestras de MSN que contienen grupos fosfato y amina funcionales se prepararon por el método de co-condensación reportado por Tamaoi (J. Lu, et al., *Small*, vol. 3, no. 8, pp. 1341-1346, 2007, J. Lu, et al., *Nanobiotechnology*, vol. 3, pp. 89-95, 2007). Una solución que contiene bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB, 0.5 g) en agua (24 mLs) y NaOH (2 M, 0.2 mL) se calentó a 80°C y se agitó vigorosamente hasta que se disolvieron los solutos. Luego se agregaron una solución que contiene los reactivos de MSN (tetraetilortosilicato, TEOS (2.5 mLs) y amino-propiltriethoxisilano, APTS (12 μ Ls)) y la mezcla se agitó a 80°C durante 15 minutos. Se agregó metilfosfonato de 3-trihidroxisililpropilo (0.63 mL) y la solución se incubó durante 2 horas a 80°C con agitación. La solución se enfrió a temperatura ambiente y luego se centrifugó (3.000 g durante 20 minutos), se lavó con 50 mLs de metanol y se secó a temperatura ambiente. El CTAB se extrajo de la MSN mediante reflujo de las partículas (850 mg) en una mezcla de metanol ácido (90 mLs de metanol y 5 mLs de HCl 12.1 M) durante 24 horas. Luego las partículas se lavaron tres veces con 50 mLs de metanol y se dejaron secar durante la noche. Las muestras de MSN se caracterizaron por mediciones de tamaño de partícula con dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta.

1.6. Doxorrubicina que se une a MSN. Las suspensiones MSN y doxorrubicina (0-2 μ mol de Dox/mg de MSN) se incubaron en 1 mL de DMSO durante la noche a temperatura ambiente. Las muestras luego se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Los sedimentos de Dox-MSN se liofilizaron y se lavaron tres veces con 1 mL de agua para eliminar Dox unido sobre el exterior de MSN. Un total de cinco muestras de Dox-MSN se prepararon para cada concentración de carga de Dox. Las muestras de Dox-MSN se resuspendieron en agua estéril a una concentración de 1 mg/mL y se almacenaron a -20°C. La cantidad de Dox unida a MSN se cuantificó al incubar 0.2 mg de muestras de Dox-MSN en metanol (1 mL) durante la noche a temperatura ambiente para extraer completamente Dox. La doxorrubicina se cuantificó mediante espectroscopia de fluorescencia (excitación = 480 nm, emisión = 550 nm).

1.7. Síntesis de Dox-MSN-PEI-GP. 25 k de PEI-GP, GP no modificado (10 μ L 1×10^8 partículas/mL) y nanopartículas de Dox-MSN (10 μ L, 5×10^{-5} a 5×10^{-2} mg de Dox-MSN/mL) se mezclaron a un volumen final de 100 μ L en solución salina al 0.9%. El rango de concentración de Dox-MSN permitió el estudio de la unión a PEI-GP en relaciones de Dox-MSN/PEI-GP de 0.0005 a 5 pg de Dox-MSN/GP. Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente y la Dox-MSN no unida se separó de la PEI-GP o las GP que contienen nanopartículas unidas mediante centrifugación (10.000 rpm durante 2 min). Las muestras de control adicionales que contienen sólo Dox-MSN se procesaron en el procedimiento de purificación. Luego, las muestras se lavaron con solución salina al 0.9% (100 μ L) para eliminar las nanopartículas no unidas del sedimento, las muestras de sedimento lavadas se resuspendió en solución salina al 0.9% (100 μ L) y la fluorescencia de la doxorrubicina se midió en todas las fracciones para cuantificar la cantidad de Dox-MSN unido y no unido. El promedio de por lo menos tres mediciones se recolectó para cada condición experimental. Las muestras de Dox-MSN-PEI-GP y Dox-MSN-GP también se evaluaron por mediciones de potencial zeta, y microscopía de fluorescencia. Se evaluaron las muestras para la estabilidad mediante incubación en solución salina de regulador fosfato (PBS, pH 7) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), o regulador de acetato de sodio (0.1 M, pH 5) durante 48 horas. En varios puntos de tiempo las muestras se procesaron mediante centrifugación para eliminar nanopartículas libres, se lavaron y las fracciones de sobrenadante se analizaron mediante espectroscopia de fluorescencia para cuantificar la Dox liberada, y las fracciones suspendidas se analizaron mediante microscopía de fluorescencia para confirmar la estabilidad de las muestras de Dox-MSN-PEI-GP.

1.8. Mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) y de potencial Zeta. El tamaño y el potencial zeta de las muestras de nanopartículas y el potencial zeta de las muestras de GP/NP se determinaron con un Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Los solventes y reguladores se filtraron a través de filtros de 0.22 μ m antes de la preparación de muestra. Una suspensión de partículas (1 mg/mL para las muestras de nanopartículas, 2×10^6 partículas/mL para las muestras de GP) se diluyó en 1 mL de regulador Hepes 20 mM, se agitaron en vórtice y se transfirieron a una cubeta de 1 mL clara de potencial zeta (DTS1061, Malvern). El potencial zeta se recolectó a 25°C de -150 a 150 mV. Los resultados son el promedio de tres muestras. Para cada muestra se recolectó un total de 30 medidas y se analizó con el software de Tecnología de Dispersión 4.20 (Malvern) que produce diagramas de distribución de potencial zeta en comparación versus conteos totales. Las mediciones DLS se

obtuvieron a partir de muestras en las mismas células de potencial zeta a 25°C. El promedio de 20 mediciones/muestra se recolectó en el rango de tamaño de 1 nm a 10000 nm. Los datos se analizaron con el software de Tecnología de Dispersión que produce histogramas de tamaños de partícula frente a % de intensidad.

- 5 1.9. Citometría de flujo (FACS). Las mediciones FACS se obtuvieron utilizando un instrumento Becton Dickinson FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ). Las muestras se prepararon para análisis FACS mediante la unión de 2×10^7 nanopartículas a 2×10^6 partículas de GP. Las muestras de NP-GP unidas se lavaron a partir de nanopartículas no unidas y se resuspendieron a 2×10^6 de GP/mL en PBS. Las GP no modificadas se utilizaron como control negativo y las GP marcados con rodamina como control positivo. Las partículas se analizaron con un láser FL4 a 605 nm al recolectar un promedio de 15000 mediciones. Se realizaron apertura y análisis utilizando el software FlowJo 6.4.2.
- 10 1.10. Suministro de células de Dox-MSN/GP. Muestras de Dox-MSN se prepararon como se describió en la sección 2.6. Las muestras Dox-MSN se unieron a 25 k de PEI-GP o partículas de GP no modificadas o como se describió en la sección 2.7. Las muestras se prepararon al unir $0-5 \times 10^{-4}$ mg de Dox-MSN/ 1×10^6 de PEI-GP o GP, equivalente a 0-5 pg de Dox-MSN/partículas de glucano. Se eligió la cantidad de partículas de PEI-GP o GP para probar la absorción celular en un 10:1
- 15 Relación de GP:célular para maximizar la absorción de células fagocíticas. Con base en la unión de Dox a Dox-MSN, las muestras Dox-MSN-PEI-GP contenían 0 a 0.15 nmol de Dox. Las nanopartículas libres de Dox-MSN y Dox soluble (Dox libre) también se evaluaron en el mismo rango de concentración. Estas muestras se evaluaron para absorción celular y suministro de Dox utilizando la estirpe celular NIH3T3- D1. Esta estirpe celular se derivó de la estirpe celular de fibroblastos NIH3T3 mediante integración del gen dectin-1 para producir células que expresan el receptor β -1,3-D-glucano dectin-1 lo que permite fagocitosis GP eficiente (J. A. Willment, et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 276, pp. 43818-43823, 2001, A. S. Marshall, et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 279, pp. 14792-14802, 2004) Las muestras se resuspendieron en medio DMEM completo (250 μ L) y se agregaron a placas de 24 pozos que contenían 1×10^5 células en 0.5 mL de medio DMEM completo. Después de incubación durante 3 horas a 37°C bajo 5% de CO₂, las células se fijaron con formalina al 1% y se observaron microscópicamente para fagocitosis de Dox-MSN/PEI-GP fluorescente. Para determinar los efectos de Dox-MSN/PEI-GP, Dox-MSN o Dox libre sobre el crecimiento y viabilidad celular de estas muestras se incubaron durante 3 horas con las células como se describió anteriormente, y las monocapas de células se lavaron en DMEM completo y se incubaron durante 48 horas adicionales. Se agregó azul Alamar (50 μ L), las células se incubaron a 37°C durante 2 horas y se midió la fluorescencia, excitación de longitud de onda = 530 nm, longitud de onda de emisión = 590 nm. La respuesta fluorescente depende de la reducción del indicador azul de Alamar al activar metabólicamente las células y es un indicador del número y viabilidad celular. La detención del crecimiento se calculó a partir de la respuesta de fluorescencia de los pozos de muestra con respecto a la respuesta de los pozos de control que contienen células incubadas en ausencia de doxorubicina. Los resultados son el promedio de cuatro muestras preparadas para cada formulación de Dox-MSN evaluada para detención del crecimiento de NIH3T3-D1.
- 20
- 25
- 30
- 35 Se han descrito en detalle la presente invención y sus realizaciones. Sin embargo, el alcance de la presente invención no pretende estar limitado a las realizaciones particulares de cualquier proceso, fabricación, composición de materia, compuestos, medios, métodos, y/o etapas descritos en la especificación. Diversas modificaciones, sustituciones, y variaciones se pueden hacer al material descrito sin apartarse de las características esenciales de la presente invención. De acuerdo con lo anterior, un experto común en la técnica apreciará fácilmente a partir de la descripción que se pueden utilizar modificaciones, sustituciones y/o variaciones posteriores que realizan sustancialmente la misma función o que logran sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones descritas aquí de acuerdo con dichas de realizaciones relacionadas de la presente invención. Por lo tanto, las siguientes reivindicaciones pretenden incluir dentro de su alcance modificaciones, sustituciones y modificaciones a los procesos, fabricación, composiciones de materia, compuestos, medios, métodos y/o etapas descritos aquí.
- 40

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para hacer un sistema de suministro de partícula-nanopartícula de pared de célula de levadura (YCWP-NP) que comprende partículas de pared de célula de levadura (YCWPs) que comprenden nanopartículas (NP) que tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 1-40 nm contenida dentro del interior de las YCWP, que comprenden las etapas de:
- (a) cargar las NP en las YCWP, en las que la carga comprende incubar una suspensión que comprende YCWPs y NP durante un tiempo suficiente para que las NP ingresen en las YCWP,
 - (b) secar el material que resulta de (a),
 - (c) opcionalmente repetir las etapas (a)-(b) por lo menos una vez,
 - 10 (d) resuspender las YCWP y nanopartículas en solvente durante un tiempo suficiente para que las NP adicionales ingresen en las YCWP,
 - (e) opcionalmente secar el material que resulta de (d), y
 - (f) opcionalmente atrapar las NP en las YCWP utilizando un medio de atrapamiento apropiado, de tal manera que se prepara el sistema de suministro YCWP-NP.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 2-40 nM, o en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 5-30 nM, o en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 10-30 nM.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la carga comprende incubar la suspensión durante aproximadamente 1-2 horas.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que el solvente es solución salina o agua.
5. El método de la reivindicación 1, en el que las nanopartículas se seleccionan del grupo que consiste de puntos cuánticos, partículas de oro y partículas magnéticas.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de atrapamiento se selecciona del grupo que consiste de un medio de atrapamiento físico, un medio de atrapamiento electrostático, un medio de atrapamiento de afinidad, y un medio de atrapamiento hidrófobo.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de atrapamiento es un medio de atrapamiento electrostático, y opcionalmente en el que el atrapamiento electrostático resulta de la interacción de la nanopartícula con una molécula de atrapamiento polimérica catiónica, por ejemplo, polietilenoimina (PEI).
8. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de atrapamiento es atrapamiento físico, y opcionalmente en el que el atrapamiento físico resulta de la interacción de la nanopartícula con una molécula de atrapamiento seleccionada del grupo que consiste de tARN, alginato y quitosano.
- 30 9. Un sistema de suministro de partícula-nanopartícula de pared celular de levadura (YCWP-NP), que comprende partículas de pared de célula de levadura (YCWPs) que comprenden nanopartículas (NP) que tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 10-1000 nm sobre la superficie de las YCWP, en las que el sistema de suministro de YCWP se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de:
- 35 (a) cargar las NP sobre las YCWP, en las que la carga comprende incubar una suspensión que comprende YCWPs y NP durante un tiempo suficiente para que las NP se unan a las YCWP, en las que las YCWP se derivan de la superficie de tal manera que se facilita la unión de NP,
- (b) lavar y/o dispersar el material que resulta de (a) y
 - 40 (c) opcionalmente repetir las etapas (a)-(b) por lo menos una vez,
- de tal manera que se prepara el sistema de suministro de YCWP-NP.
10. El sistema de suministro de YCWP-NP de la reivindicación 9, en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 10-100 nM, o en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de

aproximadamente 100-500 nM, o en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 500-1000 nM.

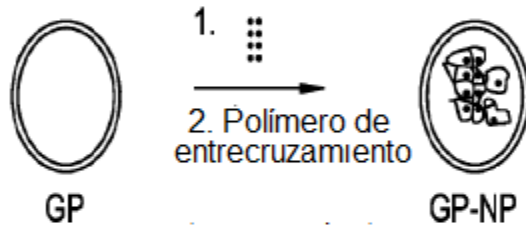
- 5 11. El sistema de suministro de YCWP-NP de la reivindicación 9, en el que las YCWP se seleccionan del grupo que consiste de partículas de glucano de levadura (YGP), partículas de glucano/manano de levadura (YGMP), partículas de quitosano de levadura (YCP) y partículas de glucano/quitosano de levadura (YGCP), preferiblemente en el que las YCWP son YGP.
12. El sistema de suministro de YCWP-NP de la reivindicación 9, en el que la carga comprende incubar la suspensión durante aproximadamente 12-24 horas.
- 10 13. El sistema de suministro de YCWP-NP de la reivindicación 9, en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para que tengan una superficie electrostática, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para tener una superficie catiónica, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para tener una superficie aniónica, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para facilitar unión covalente o por afinidad de las NP a la superficie, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para facilitar unión de biotina a estreptavidina de NP a la superficie.
- 15 14. El sistema de suministro de YCWP-NP de la reivindicación 13, en el que las YCWP tienen un polímero de atrapamiento ligado covalentemente a la superficie, opcionalmente en el que el polímero de atrapamiento se selecciona del grupo que consiste de polietilenoimina (PEI), polilisina (PLL) y quitosano.
15. El sistema de suministro de YCWP-NP de la reivindicación 9, en el que las nanopartículas se seleccionan del grupo que consiste de puntos cuánticos, partículas de oro y partículas magnéticas.
- 20 16. Un método para hacer un sistema de suministro de partícula-nanopartícula de pared celular de levadura (YCWP-NP), que comprende partículas de pared de célula de levadura (YCWPs) que comprenden nanopartículas (NP) que tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 10-1000 nm sobre la superficie de las YCWP, que comprende las etapas de:
- 25 (a) cargar las NP sobre las YCWP, en las que la carga comprende incubar una suspensión que comprende YCWPs y NP durante un tiempo suficiente para que las NP se unan a las YCWP, en las que las YCWP se derivan de la superficie de tal manera que se facilita la unión de NP,
- (b) lavar y/o dispersar el material que resulta de (a) y
- (c) opcionalmente repetir las etapas (a)-(b) por lo menos una vez, de tal manera que se prepara el sistema de suministro de YCWP-NP.
- 30 17. El método de la reivindicación 16, en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 10-100 nM, o en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 100-500 nM, o en el que las NP tienen por lo menos una dimensión de aproximadamente 500-1000 nM.
- 35 18. El método de la reivindicación 1 o 16, en el que las YCWP se seleccionan del grupo que consiste de partículas de glucano de levadura (YGP), partículas de glucano/manano de levadura (YGMP), partículas de quitano de levadura (YCP) y partículas de glucano/quitosano de levadura (YGCP), preferiblemente en donde las YCWP son YGP.
19. El método de la reivindicación 16, en el que la carga comprende incubar la suspensión durante aproximadamente 12-24 horas.
- 40 20. El método de la reivindicación 16, en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para tener una superficie electrostática, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para tener una superficie catiónica, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para tener una superficie aniónica, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para facilitar unión covalente o por afinidad de las NP a la superficie, o en el que las YCPW derivadas de superficie se derivan para facilitar unión de biotina a estreptavidina de NP a la superficie.
- 45 21. El método de la reivindicación 16, en el que las YCWP tienen un polímero de atrapamiento ligado covalentemente a la superficie, opcionalmente en el que el polímero de atrapamiento se selecciona del grupo que consiste de polietilenoimina (PEI), polilisina (PLL) y quitosano.

22. El método de la reivindicación 1 o 16, en el que las nanopartículas se seleccionan del grupo que consiste de puntos cuánticos, partículas de oro y partículas magnéticas.

23. Un método para utilizar el sistema de suministro de YCWP-NP de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el suministro de fármacos o en la formación de imágenes médicas.

FIG. 1

Encapsulación GP de NP pequeñas (< 30 nm)



Unión de NP grandes a GP derivadas de superficie

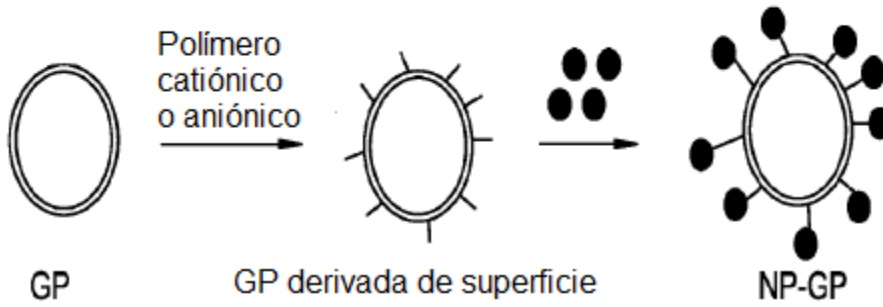


FIG. 2A

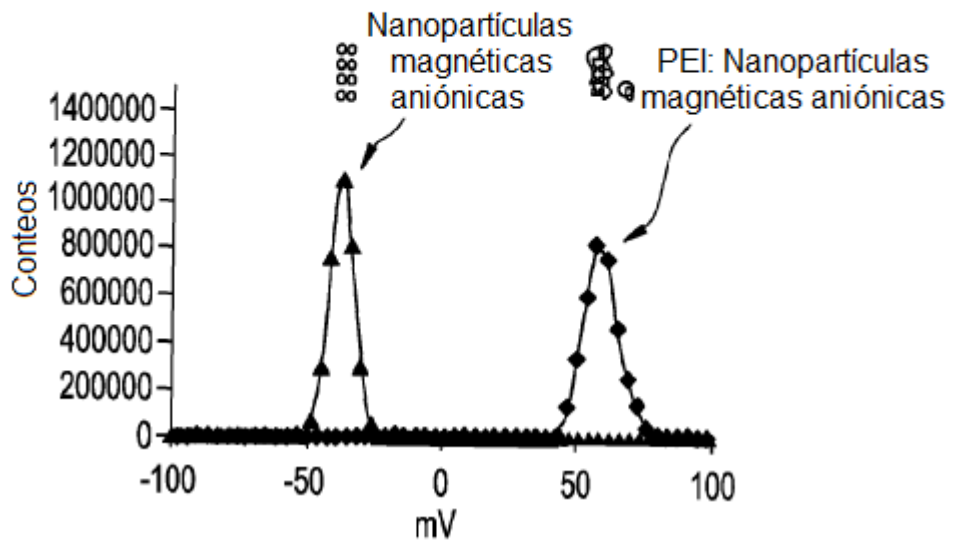


FIG. 2B

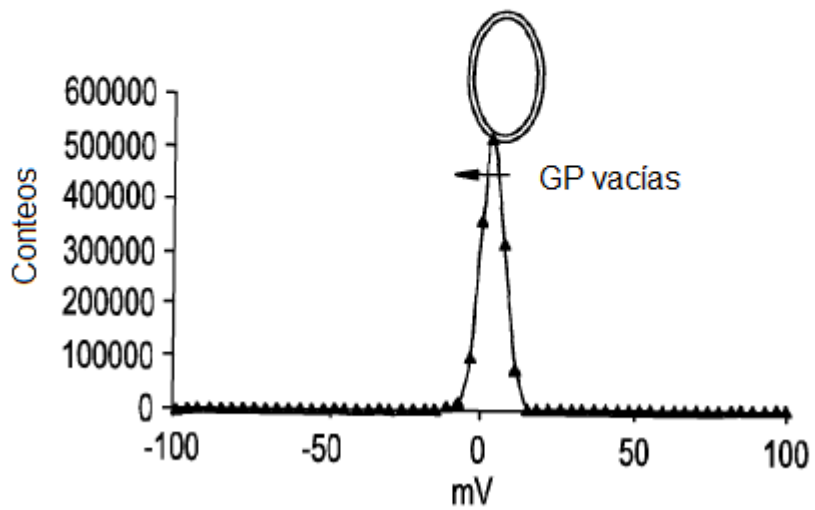


FIG. 3A

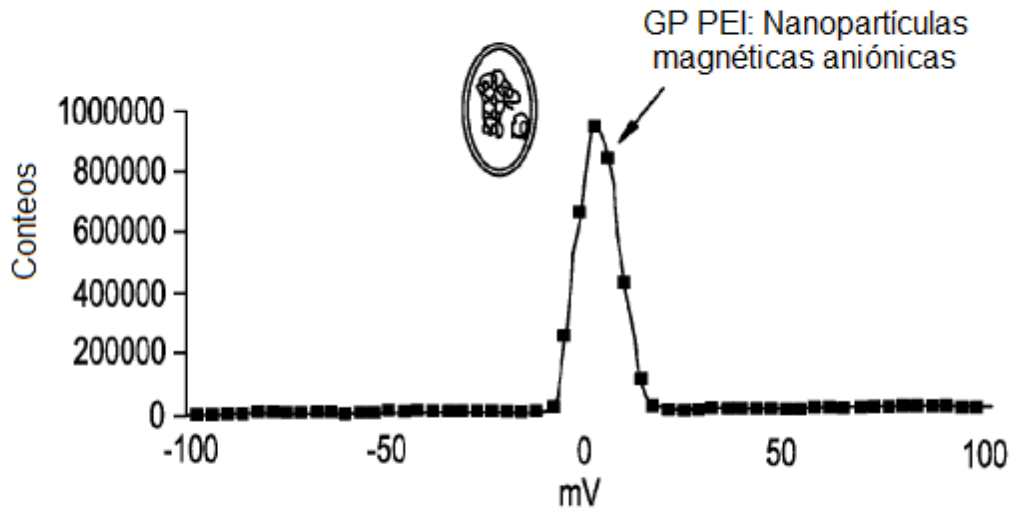


FIG. 3B

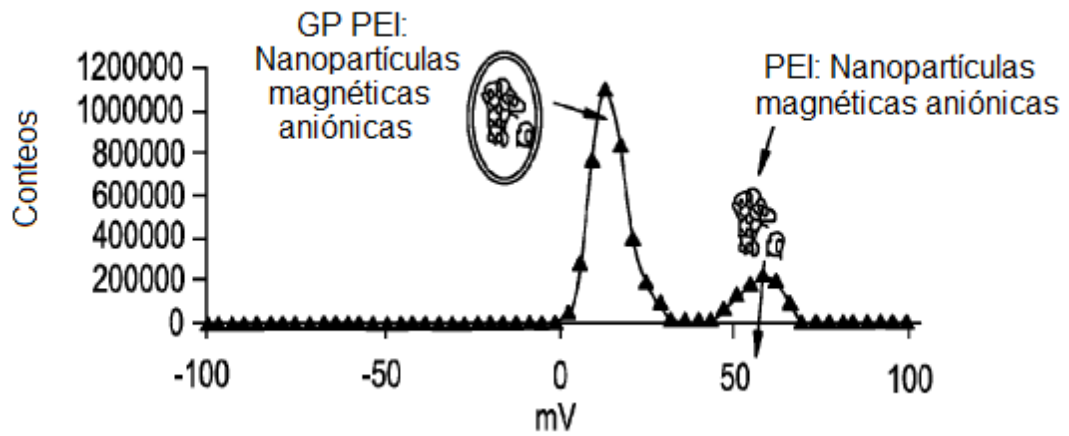


FIG. 4

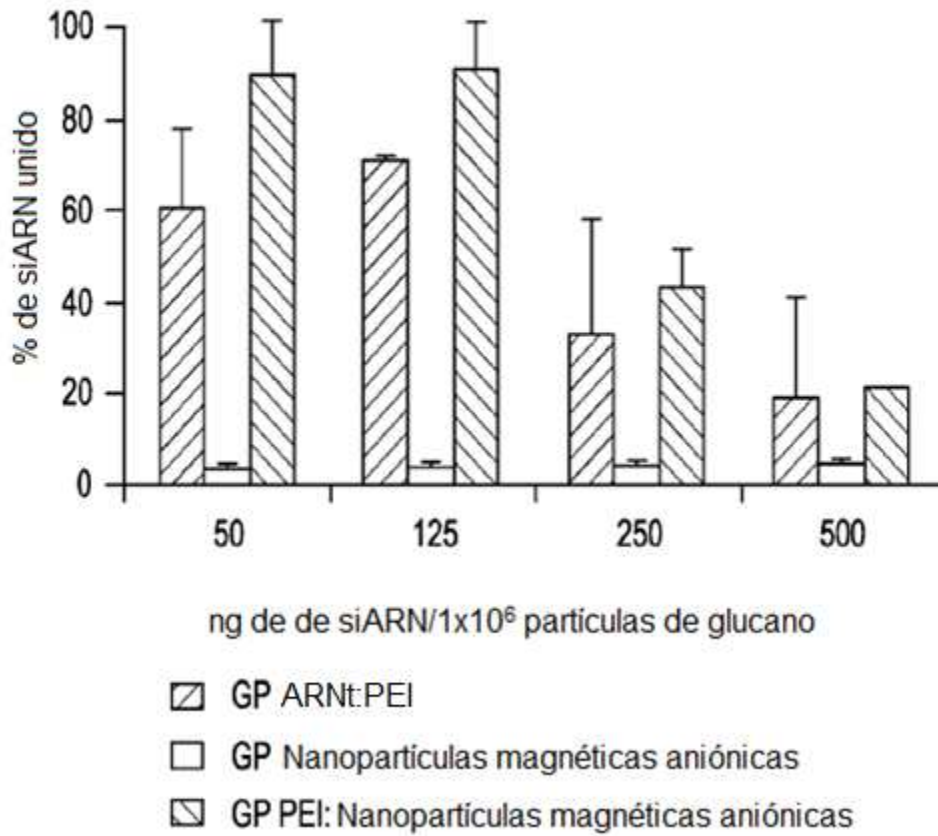


FIG. 5

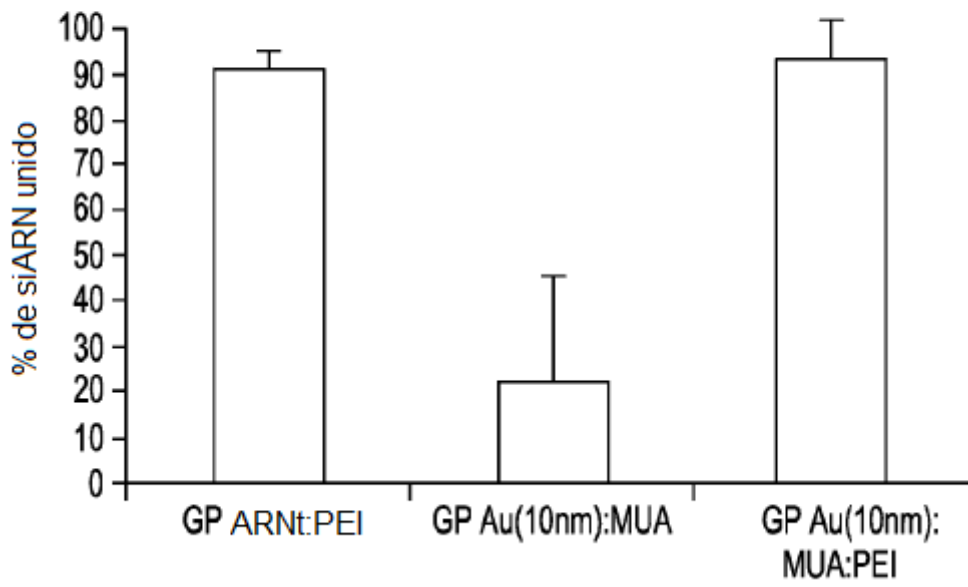
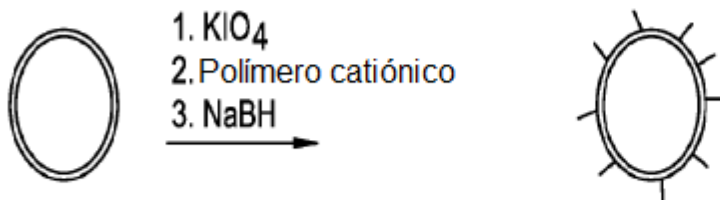


FIG. 6A

Acoplamiento covalente de polímeros catiónicos a GP a través de aminación reductora



GP con polímeros catiónicos
TP-GP (es decir PEI, poli-L-lisina, quitosano)

FIG. 6B

Unión no covalente de nanopartículas de poliestireno carboxilado con rodamina 200 nm (Invitrogen) a TP-GP

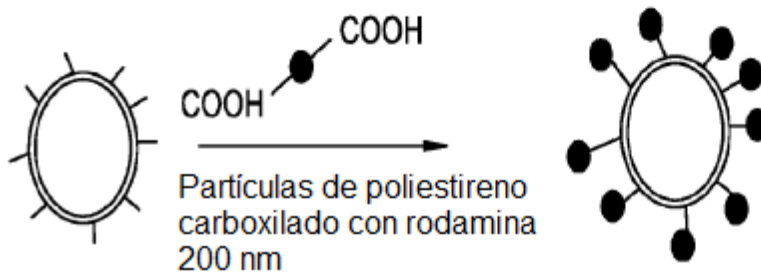


FIG. 7A

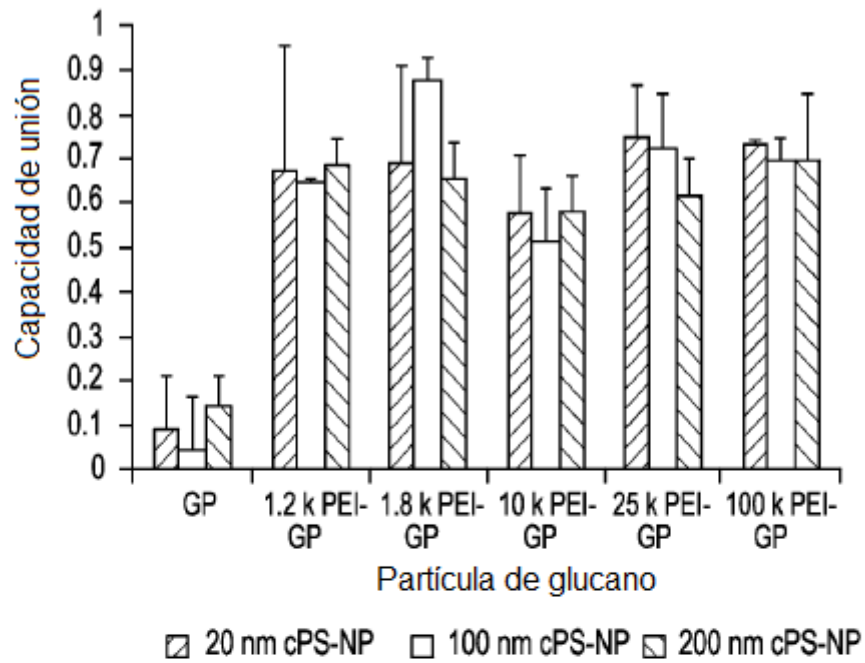


FIG. 7B

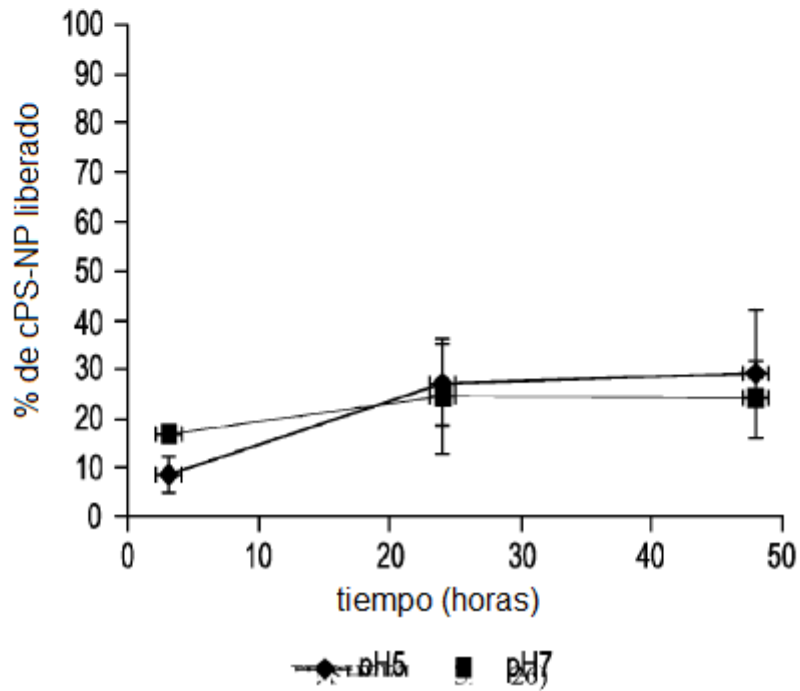


FIG. 8A

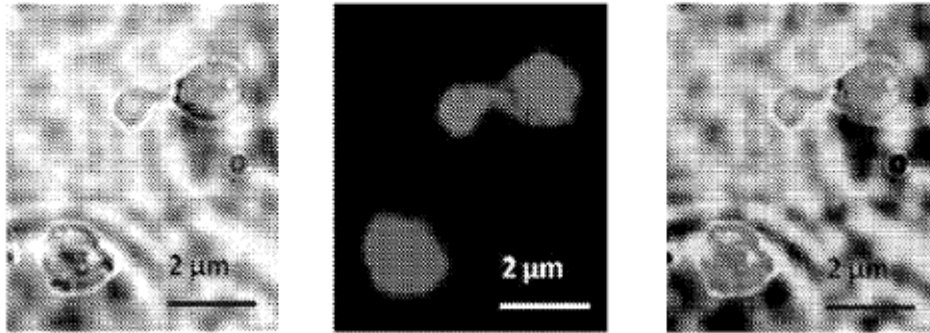


FIG. 8B

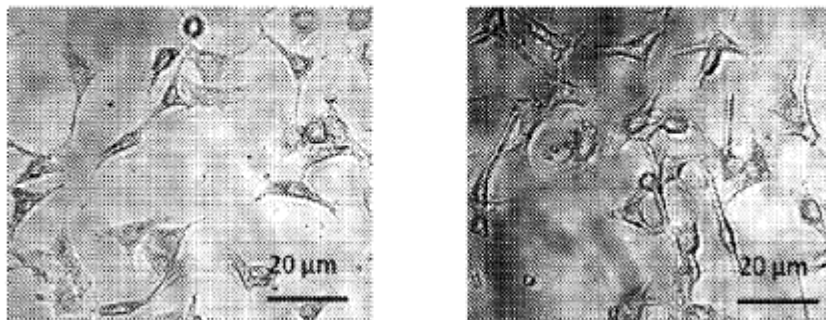


FIG. 9A

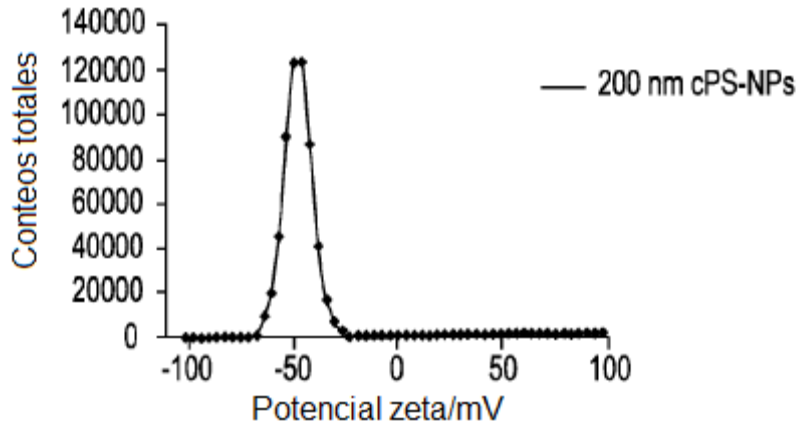


FIG. 9B

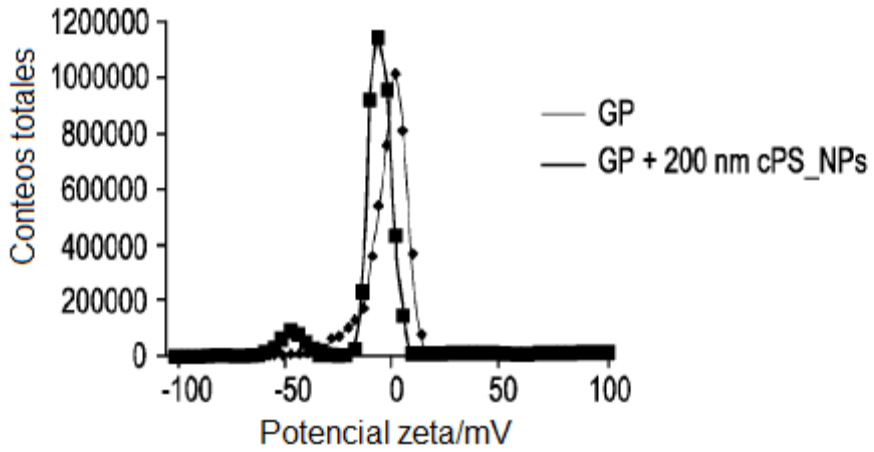


FIG. 9C

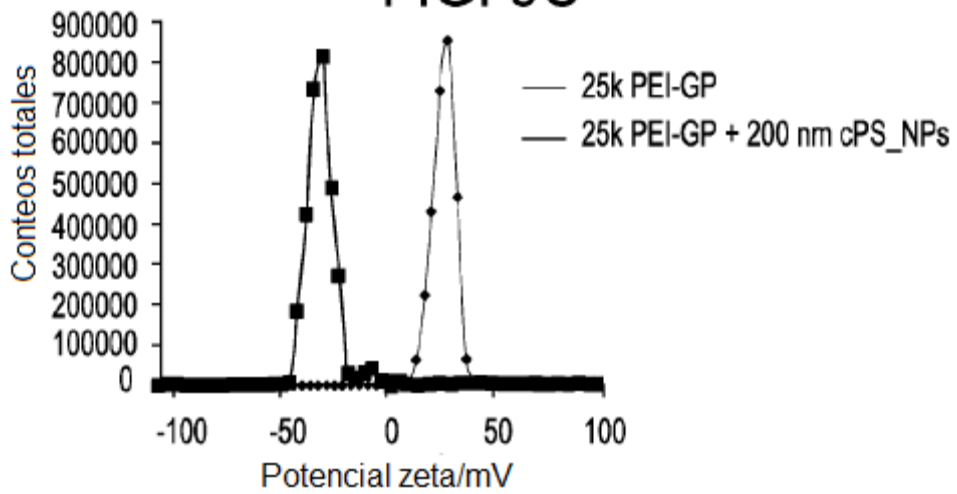


FIG. 10A

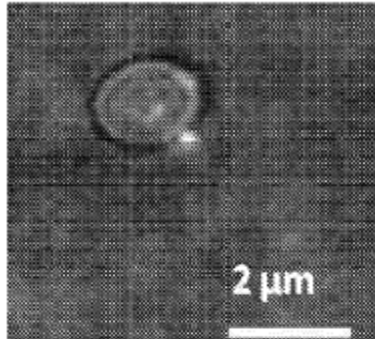


FIG. 10B

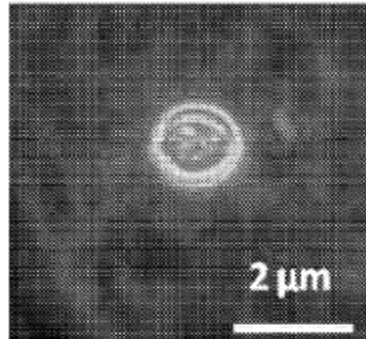


FIG. 10C

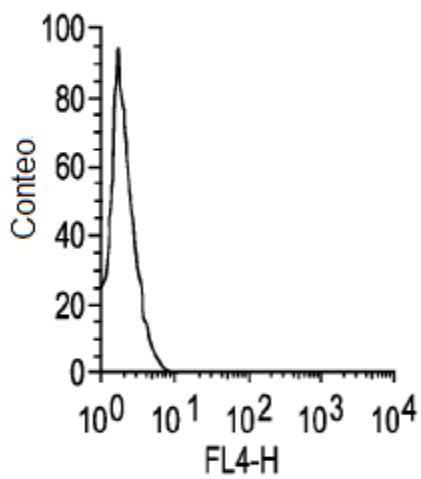


FIG. 10D

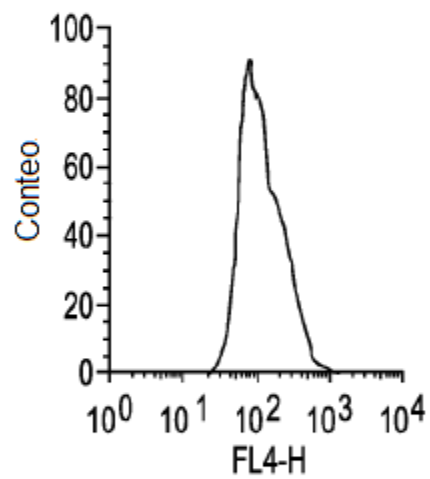


FIG. 10E

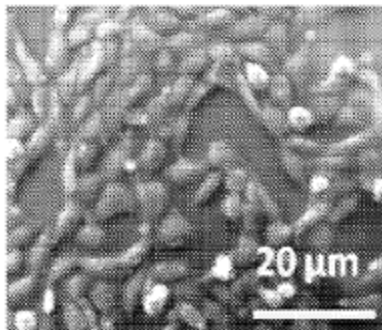


FIG. 10F

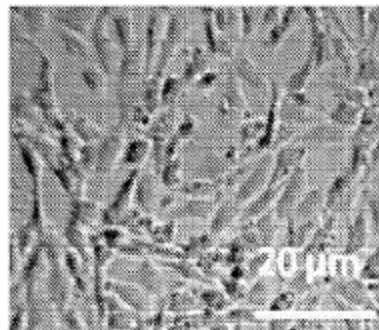


FIG. 11

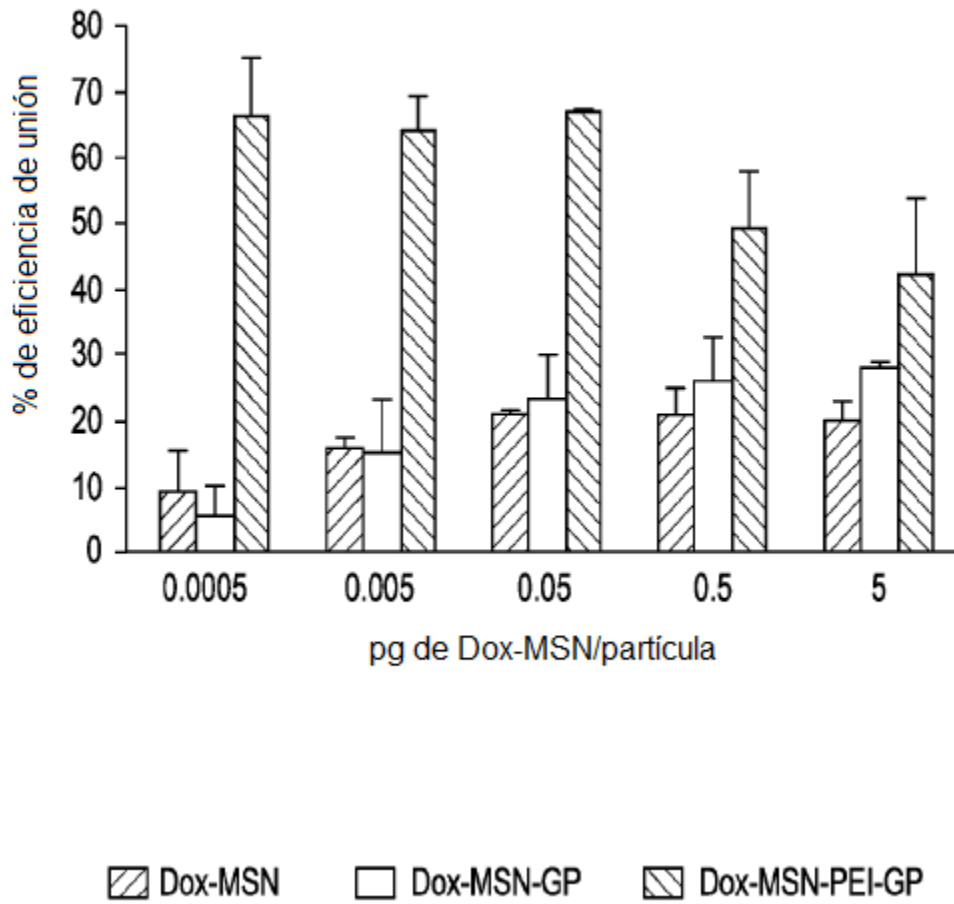


FIG. 12A

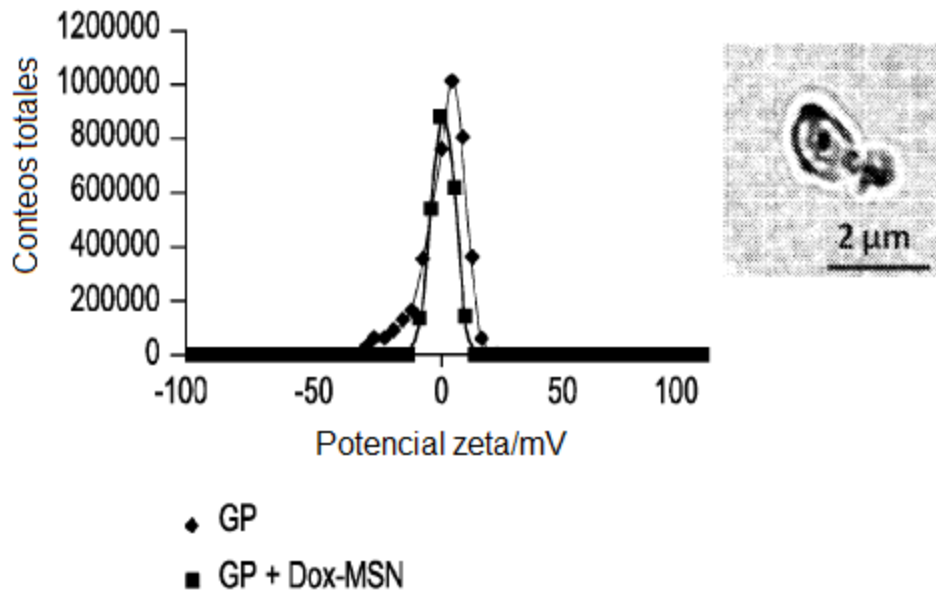


FIG. 12B

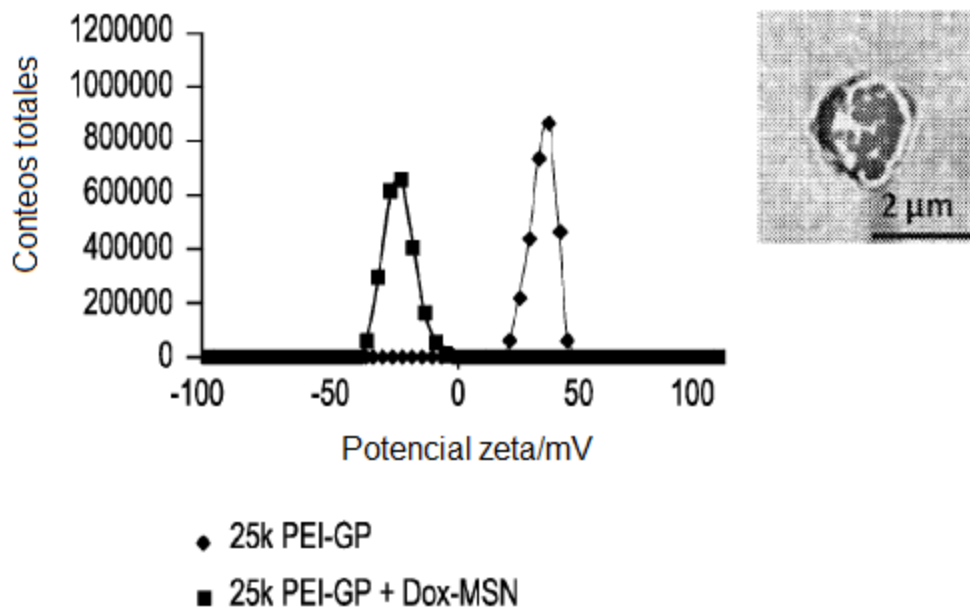
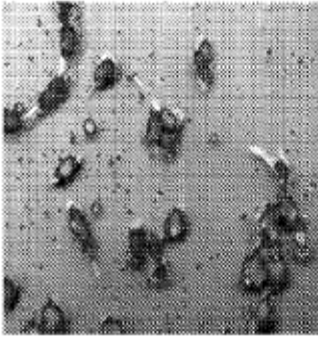


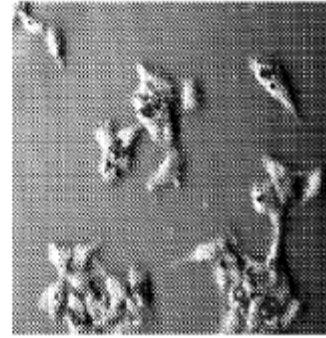
FIG. 13



Dox-MSN + 25 k PEI-GP

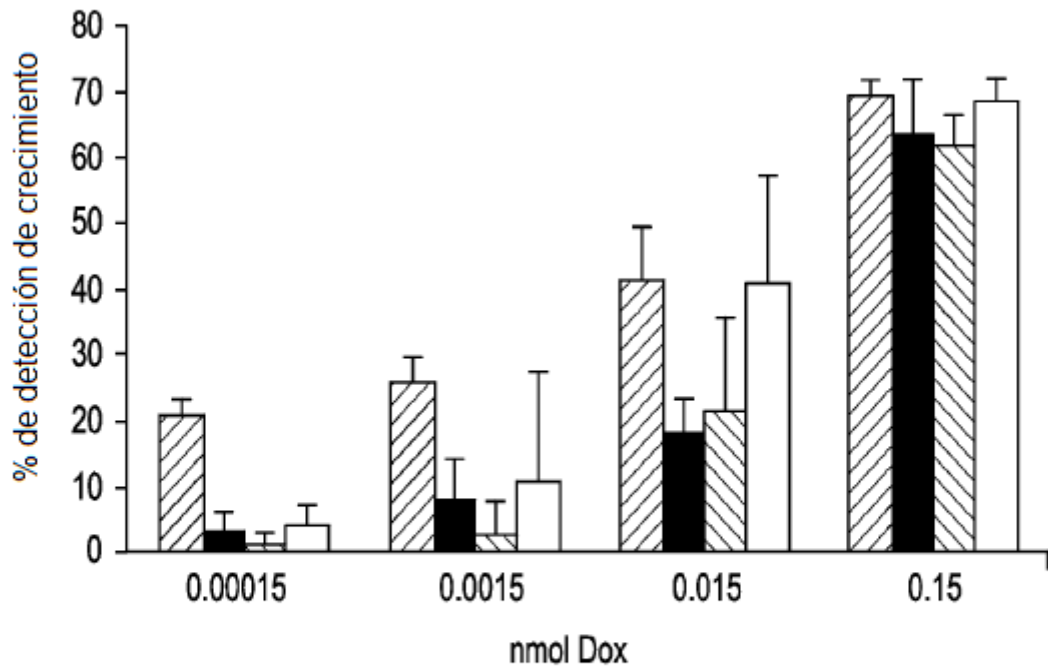


Dox-MSN + GP



Dox-MSN

FIG. 14



Dox-MSN-PEI-GP
 Dox-MSN-GP
 Dox-MSN
 Dox

FIG. 15

