

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 501**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2015 PCT/EP2015/061538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2015 E 15725006 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3148515**

54 Título: **Nanopartícula**

30 Prioridad:

28.05.2014 EP 14170333

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

17.06.2020

73 Titular/es:

**EVONIK OPERATIONS GMBH (100.0%)
Rellinghauser Straße 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**LIZIO, ROSARIO;
GRIMM, SILKO;
PETEREIT, HANS-ULRICH;
EPPLE, MATTHIAS y
DÖRDELMANN, GREGOR**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 767 501 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

Nanopartícula

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a nanopartículas de polímero de fosfato de calcio-ácido láctico, respectivamente nanopartículas para el suministro de ingredientes activos a células vivas de mamíferos.

Antecedente técnico

Los polímeros de ácido láctico, como por ejemplo los copolímeros de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA), son polímeros biodegradables y bien conocidos en la técnica, por ejemplo, a partir de los documentos EP1468035, US6706854, WO2007/009919A2, EP1907023A, EP2263707A, EP2147036, EP0427185 o US5610266.

10 El documento US 2005/0053590A1 describe una nanopartícula dirigida al endotelio para revertir la disfunción endotelial. Un método para mejorar la disfunción celular comprende las etapas de proporcionar una composición que se dirige específicamente a una célula endotelial disfuncional que comprende un ligando seleccionador de dianas que se une específicamente a una célula endotelial y un ácido nucleico, y suministrar la composición a la célula en condiciones que aumentan la concentración intracelular de tetrahidrobiopterina. La composición puede comprender además una nanopartícula seleccionada de una larga lista de tipos adecuados de nanopartículas, que incluyen
15 nanopartículas de fosfato de calcio y nanopartículas biodegradables formuladas a partir de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) o combinaciones de los diferentes tipos de nanopartículas mencionados allí.

20 El documento WO 2007/048599 describe sistemas de suministro de fármacos en partículas basados en un vehículo polimérico, caracterizado por que se incluye al menos una sustancia señal para el transporte a través de una barrera biológica y al menos un ingrediente activo, no mostrando el vehículo, la sustancia señal y el ingrediente activo enlaces covalentes entre ellos. La sustancia señal (péptido de penetración celular (CPP)) es lactoferrina o un péptido derivado de la lactoferrina.

En una realización particularmente preferida, un péptido señal con la secuencia de aminoácidos

KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No.1 (=SEQ ID No. 3 en el documento WO 2007/048599)),

25 CFQWQRNMRKVRGPPVSC (SEQ ID No.2 (=SEQ ID No. 4 en el documento WO 2007/048599)),

FQWQRNMRKVRGPPVS (SEQ ID No.3 (=SEQ ID No. 5 en el documento WO 2007/048599)),

FQWQRNMRKVR (SEQ ID No.4 (=SEQ ID No. 6 en el documento WO 2007/048599)),

KCRRWQWRMKKLGAPSITCVRR (SEQ ID No.5 (=SEQ ID No. 29 en el documento WO 2007/048599)) y

CRRWQWRMKKLGAPSITC (SEQ ID No.6 (=SEQ ID No. 30 en el documento WO 2007/048599))

30 o un derivado del mismo.

En una realización preferida, los péptidos de penetración celular del documento WO 2007/048599 comprenden una secuencia de aminoácidos como se muestra en el documento WO 2007/048599 en SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 30, o una secuencia correspondiente con una identidad de al menos 40%, preferiblemente de al menos 50%, particularmente de forma preferible con una identidad de más de 75%, o mejor de
35 más de 90%.

El documento WO 2007/076904A1 describe un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la proteína de lactoferrina humana o de la proteína de lactoferrina bovina, por lo que el péptido es adecuado para actuar como un péptido de penetración celular (CPP). Muchos de los péptidos mencionados en el documento WO 2007/076904A1 y en WO 2007/048599 son idénticos.

40 El péptido de penetración celular más prometedor con los mejores efectos en los ejemplos es KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No.1 (=SEQ ID No. 3 en WO 2007/048599 y en WO 2007/076904A1)).

Los péptidos de penetración celular derivados de lactoferrina están destinados a permitir el transporte de moléculas de carga, que son ingredientes farmacéuticos activos como el ADN, ARN, péptidos o antígenos para vacunación, que pueden ser ingeridos por vía oral, a través de las membranas biológicas, y de este modo permiten una absorción eficiente de estas moléculas en el organismo humano o animal.

45 El documento WO2014/141288A1 (fecha de publicación internacional 18 de septiembre de 2014) describe un nanomaterial que muestra propiedades multifuncionales como la radiactividad, la dispersión Raman, la fluorescencia del infrarrojo cercano (NIR), el para- o superparamagnetismo y la absorción de rayos X. El agente de nanocontraste multifuncional puede tener una forma esférica o no esférica, y un tamaño que varía de 1 a 200 nm, y puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular u oral. El nanomaterial se basa en nanopartículas de fosfato de
50

- calcio. Las nanopartículas funcionan como un agente de nanocontraste multifuncional que puede conjugarse o cargarse con moléculas de fármacos tales como bifosfonatos, quimioterápicos, agentes de terapia génica contra el cáncer, fragmentos de ARN (ARNip, mi-ARN), fármacos fotosensibles, inhibidores de moléculas pequeñas, antibióticos. Los nanopartículas de fosfato de calcio pueden formularse en una cubierta polimérica de un polímero biodegradable que contiene los fármacos. El polímero biodegradable puede ser, entre otros, un poliácido láctico (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polietilenoimina (PEI), quitosano o carboximetil quitosano. Los nanopartículas pueden conjugarse en su superficie con ligandos seleccionadores de dianas, tales como ácido fólico, anticuerpos, péptidos, aptámeros o hidratos de carbono. Se pueden añadir agentes de protección tales como citrato, polímeros tales como PEG, polietilenoimina, bifosfonatos.
- 5
- 10 Norihiro Watanabe et al. describen "Transgenic Expression of a Novel Immunosuppressive Signal Converter on T-cells", *Molecular Therapy*, vol.21, 2013-05-01, p. S153-S153, (XP055131645).
- Ping Zeng et al.: "Chitosan-modified poly(lactide-co-glycolide) nanospheres for plasmid DNA delivery and HBV gene silencing", *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier BV, NL, vol.415, 2011-05-20, p. 259-266 (XP028099873, ISSN: 0378-5173). Ping Zeng et al. describen nanopartículas formuladas usando poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para la administración de ADN plasmídico (ADNp).
- 15
- Jie Tang et al. describen en *Acta Pharmaceutica Sinica* 2013, 48 (2): 298 - 304, la preparación y evaluación in vitro de nanopartículas de fosfato de calcio-ADNp (ADNp-CaPi) que se encapsulan en copolímero de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) en una estructura de núcleo/cubierta (CS). Las partículas de estructura de núcleo/cubierta (CS-ADNp-CaPi-PLGA-NPs) se comparan con las nanopartículas de PLGA modificadas con CaPi embebidas (ADNp-CaPi-PLGA-NPs embebidas). Las nanopartículas de estructura de núcleo/cubierta (CS-ADNp-CaPi-PLGA-NPs) tenían forma esférica con un tamaño medio de partículas de 155 +/- 4,5 nm, potenciales zeta de -0,38 +/- 0,1 mV, una eficiencia de atrapamiento de 80,56 +/- 2,5% y una eficiencia de carga de 1,16 +/- 0,04%. Las partículas de estructura de núcleo/cubierta eran estables en los medios de liberación, y podían proteger el ADNp contra la degradación de la nucleasa. También exhibieron liberación sostenida de ADNp in vitro. La mayor eficiencia de transfección génica de las CS-ADNp-CaPi-PLGA-NPs in vitro alcanzó (24,66 +/- 0,46)% después de 72 h de transfección, que fue significativamente mayor que la del ADNp libre [(0,33 +/- 0,04)% , $P < 0,01$] y ADNp-PLGA-NPs [(1,5 +/- 0,07)% , $P < 0,01$]. La transfección duró más tiempo que la de las ADNp-CaPi-PLGA-NPs embebidas, y la citotoxicidad fue significativamente menor que la de la polietilenoimina (PEI). Por lo tanto, se supone que las CS-ADNp-CaPi-PLGA-NPs son vectores genéticos no virales prometedores.
- 20
- 25
- 30 Jie Tang et al.: "Calcium phosphate embedded PLGA nanoparticles: A promising gene delivery vector with high gene loading and transfection efficiency", *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier BV, NL, vol.431, 2012-04-17, p. 210-221 (XP028503199, ISSN: 0378-5173). Jie Tang et al. describen la preparación y la evaluación in vitro de nanopartículas de fosfato de calcio-ADNp (ADNp-CaPi) que se encapsulan en copolímero de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA). Se encontró que la eficiencia de transfección de estas nanopartículas en células de riñón embrionario humano era mucho mayor con nanopartículas de PLGA cargadas con ADNp que con micropartículas de PLGA embebidas con CaPi-ADNp.
- 35
- (Mingzhen Zang et al: "Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents", *Nano today*, vol.4, no.6, 2009-12-01, p. 508-517 (XP055153407; ISSN: 1748-0132). Se describe el uso de materiales compuestos de fosfato de calcio nanoestructurados, con énfasis en los sistemas de suministro de fosfato de calcio PEGilados, especialmente para ácidos nucleicos como el ARNip.
- 40
- Objeto y solución
- Tang J. et al. describen, en *Acta Pharmaceutica Sinica* 2013, 48 (2): 298 - 304, la preparación y evaluación in vitro de nanopartículas de fosfato de calcio-ADNp (ADNp-CaPi-NP) que están encapsuladas en copolímero de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) en una estructura de núcleo/cubierta (CS). Se supone que las nanopartículas de CS-ADNp-CaPi-PLGA son vectores genéticos no virales prometedores.
- 45
- Era un objeto de la invención mejorar la eficiencia de transferencia de suministro de CS-ADNp-CaPi-PLGA-NPs para lograr vectores para el suministro mejorado de ingredientes activos, especialmente el de proteínas de péptidos o ácidos nucleicos a células vivas. Otro objeto era mejorar la eficacia del silenciamiento génico mediado por ARNip. Al mismo tiempo, no se debe aumentar la toxicidad del vector de suministro.
- 50
- El objeto fue resuelto mediante una nanopartícula, en el que la nanopartícula se combina a partir de los componentes a), b), c) y d) como se reivindica y, por lo tanto, también se puede llamar una "nanopartícula combinada", con un diámetro, que es el máximo en la distribución de tamaños de nanopartículas, en el intervalo de 10 - 300 nm, que comprende
- a) un núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a),
- 55 b) un revestimiento de ingrediente activo b) sobre el núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a),
- c) un revestimiento de polímero de ácido láctico c) sobre el revestimiento de ingrediente activo b)

d) un revestimiento de polímero catiónico d) sobre el revestimiento de polímero de ácido láctico c), seleccionado del grupo de polietiliminas, quitosano y péptidos derivados de lactoferrina humana con una longitud de 14 a 30 aminoácidos.

5 La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solamente con fines informativos.

Descripción detallada

Nanopartícula (nanopartícula combinada)

10 La nanopartícula inventiva se combina a partir de los componentes a), b), c) y d) como se reivindica y, por lo tanto, puede denominarse un "nanopartícula combinada". Las nanopartículas inventivas pueden ser de forma esférica. Las nanopartículas pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de 10 - 600, 20 - 500, 50 - 250 nm, en el que el diámetro promedio se determina preferiblemente por dispersión dinámica de luz (DLS, % de intensidad). Las nanopartículas pueden tener un diámetro, que es el máximo en la distribución de tamaños de nanopartículas (valor máximo), en el intervalo de 10 - 300, 20 - 250, 80 - 150 nm, en el que el máximo en la distribución de tamaños de nanopartículas se determina preferiblemente por dispersión dinámica de luz (DLS por número). El índice de polidispersidad (DLS) de las nanopartículas puede estar en el intervalo de 0 - 0,8, 0,05 - 0,7, 0,1 - 0,7, 0,3 - 0,7.

Núcleo de nanopartículas de fosfato de calcio a)

20 La nanopartícula inventiva comprende un núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con un ingrediente activo b) revestido sobre él. El núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con un ingrediente activo b) revestido sobre él puede tener un diámetro promedio en el intervalo de 10 - 400, 20 - 300, 50 - 200 nm. El diámetro promedio se determina preferiblemente por dispersión dinámica de luz (DLS). El índice de polidispersidad del núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con un ingrediente activo b) revestido sobre él puede estar en el intervalo de 0 - 0,7, 0,05 - 0,7, 0,1 - 0,7, 0,3 - 0,7.

Revestimiento de ingrediente activo b)

25 La nanopartícula inventiva comprende un revestimiento de ingrediente activo b) en el que un ingrediente activo se reviste sobre la nanopartícula de fosfato de calcio a). Un revestimiento de ingrediente activo es un revestimiento que comprende o consiste en un ingrediente activo. "Revestido sobre" también puede tener el significado de "asociado con" o "asociado sobre la superficie" de la nanopartícula de fosfato de calcio. La nanopartícula de fosfato de calcio a) se puede estabilizar preferiblemente mediante una capa de revestimiento del ingrediente activo, que evita la aglomeración o el crecimiento adicional de las nanopartículas de fosfato de calcio. El revestimiento o la capa de revestimiento se une a la superficie de las nanopartículas de fosfato de calcio por interacción iónica o electrostática.

35 Un núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con un revestimiento de ingrediente activo b) se puede preparar mezclando disoluciones acuosas que comprenden iones de calcio e iones de fosfato con adición, preferiblemente en una disolución acuosa, de un ingrediente activo durante un tiempo de residencia (nucleación) durante al menos 1, preferiblemente 1 - 5 o 1 - 60 segundos. Después o durante el tiempo de residencia, las nanopartículas de fosfato de calcio con el ingrediente activo revestido sobre ellas se forman en el transcurso o después del proceso de precipitación.

Un ingrediente activo en el sentido de la presente solicitud es una sustancia que puede administrarse a un cuerpo humano o de mamífero para lograr un efecto terapéutico y/o curar una enfermedad. Preferiblemente, el ingrediente activo es soluble en agua. El ingrediente activo es preferiblemente un péptido, una proteína o un ácido nucleico.

40 El ingrediente activo puede ser preferiblemente un péptido, que es diferente del péptido derivado de lactoferrina humana, que puede usarse como revestimiento de polímero catiónico d) y que no se considera como un ingrediente activo en el sentido de la invención.

Ejemplos de péptidos adecuados son, por ejemplo, hormonas peptídicas tales como una hormona de crecimiento humana.

45 Ejemplos de proteínas adecuadas son, por ejemplo, anticuerpos, interleucinas, interferones, vacunas basadas en proteínas.

El ingrediente activo puede ser un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN bicatenario o monocatenario, ADN de plásmido (ADNp).

El ingrediente activo puede ser un ARNip (ARN interferente pequeño).

50 El término "ARNip" es bien conocido por un experto en la técnica. Un ARNip típico puede definirse como un ARN bicatenario de aproximadamente 19-23 pares de bases de longitud, en el que las cadenas individuales pueden solaparse en el extremo 3' para dos nucleótidos. Los ARNip son productos de escisión de ARN bicatenarios grandes, tales como ARNm celular o ARN generado a partir de virus durante su replicación en células vivas. Estos

tipos de ARN pueden reducirse a los ARNip, por ejemplo mediante la enzima "Dicer", que es una ARNasa de tipo III. Los ARNip desempeñan un papel importante en los procesos de silenciamiento génico postranscripcionales. Los ARNip más largos, por ejemplo 60 pares de bases o más, también pueden sintetizarse por medio de vectores de expresión. Por lo tanto, los ARNip son de gran interés para ser usados como ingredientes activos con el fin de lograr ciertos efectos terapéuticos y/o curar ciertas enfermedades.

Revestimiento de polímero de ácido láctico c)

La nanopartícula inventiva comprende un revestimiento de polímero de ácido láctico c) sobre el revestimiento de ingrediente activo b) respectivamente sobre el núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el ingrediente activo b) revestido sobre él. Un revestimiento de polímero de ácido láctico es un revestimiento que comprende, que comprende esencialmente o que consiste en, un polímero de ácido láctico.

El núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el ingrediente activo puede usarse como la fase acuosa interna (W1) para una emulsión de agua en aceite en agua (W1/O/W2), en la que el polímero de ácido láctico para el revestimiento de polímero de ácido de láctico c) se puede añadir en una disolución orgánica a una fase acuosa (W1) que contiene el núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el ingrediente activo b) sobre él, con tratamiento ultrasónico, para dar una emulsión de agua en aceite (W1/O), y en la que la emulsión de agua en aceite (W1/O) se puede añadir a un exceso de otra fase acuosa (W2), con tratamiento ultrasónico, para dar la emulsión de agua en aceite en agua (W1/O/W2), en la que el disolvente orgánico puede eliminarse para dar una primera dispersión, en el que el contenido sólido de la primera dispersión puede recogerse por centrifugación o filtración de flujo tangencial y puede redispersarse en agua y puede secarse para dar partículas sólidas.

La expresión "polímero de ácido láctico" significará polímeros o copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico o lactida polimerizadas, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70% por peso, o hasta 100% de unidades de ácido láctico o lactida polimerizadas. Una lactida es un diéster cíclico de ácido láctico. El término lactida comprenderá L-lactida, D-lactida o D,L-lactida. La polimerización de lactidas a polímeros de poliácido láctico puede realizarse por policondensación en condiciones de apertura del anillo. Los comonómeros adecuados que pueden polimerizarse con el ácido láctico o lactida son respectivamente glicolida, épsilon-caprolactona, carbonato de trimetileno, o dioxanona. Los polímeros de ácido láctico pueden incluir también un copolímero de bloques AB o ABA que contiene un bloque A seleccionado de polímeros de ácido láctico y un bloque B seleccionado de un polímero de polietilenglicol.

El polímero de ácido láctico puede seleccionarse preferiblemente de polímeros o copolímeros de ácido láctico sintetizados a partir de componentes monoméricos o de una mezcla de componentes monoméricos seleccionados del grupo que consiste en a) a l):

a) D- y L-lactida,

b) L-lactida y glicolida,

c) D,L-lactida y glicolida,

d) L-lactida y épsilon-caprolactona,

e) L-lactida y dioxanona,

f) L-lactida y carbonato de trimetileno,

g) L-lactida, D-lactida o D,L-lactida,

h) L-lactida,

i) DL-lactida,

j) unidades monoméricas distribuidas estadísticamente de L-lactida, D-lactida o D,L-lactida y épsilon-caprolactona,

k) unidades monoméricas distribuidas estadísticamente de L-lactida, D-lactida o D,L-lactida y dioxanona,

l) unidades monoméricas distribuidas estadísticamente de L-lactida, D-lactida o DL-lactida y carbonato de trimetileno.

Este tipo de "polímeros de ácido láctico" son polímeros biodegradables y bien conocidos en la técnica, por ejemplo desde los documentos EP1468035, US6706854, WO2007/009919A2, EP1907023A, EP2263707A, EP2147036, EP0427185 o US5610266.

Preferiblemente, el polímero de ácido láctico es un copolímero de lactida-glicolida.

Preferiblemente, el polímero de ácido láctico es un copolímero de poli(D,L-lactida-co-glicolida) con una viscosidad inherente IV de 0,1 - 2,0, 0,12 - 1,2, 0,14 - 1,0, 0,16 - 0,44, 0,16 - 0,24 [dl/g].

Un polímero de ácido láctico preferido es un copolímero de poli(D,L-lactida-co-glicolida) con una proporción de D,L-lactida : glicolida en el copolímero de poli(D,L-lactida-co-glicolida) de 80:20 a 20:80, 70:30 a 30:70, 60:40 a 40:60, u 80:20 a 60:40 partes en peso, en el que las partes D,L-lactida : glicolida suman 100 partes (100%)

5 Los polímeros de ácido láctico preferidos son del tipo de RESOMER® RG 502 (grupo terminal de éster) o RESOMER® RG 502 H (grupo terminal de ácido) que son copolímeros de poli(D,L-lactida-co-glicolida) con una relación D,L-lactida : glicolida de 45:55 a 55:45, preferiblemente 50:50) y con una viscosidad inherente IV en el intervalo de 0,16 - 0,44, o 0,16 - 0,24 [dl/g].

10 El peso molecular (M_w) de los polímeros de ácido láctico puede estar en el intervalo de 1.000 – 1000.000, preferiblemente en el intervalo de 2.000 – 100.000, preferiblemente en el intervalo de 3.000 a 25.000 g/mol. Una persona experta conoce bien los métodos analíticos para determinar el peso molecular (M_w = peso molecular promedio). En general, el peso molecular M_w puede determinarse mediante cromatografía de permeación en gel o mediante un método de dispersión de luz (véase, por ejemplo, HF Mark et al., Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2ª edición, Vol. 10, páginas 1 y siguientes, J. Wiley, 1989).

15 El polímero de ácido láctico puede caracterizarse por una temperatura de transición vítrea T_g de aproximadamente 30 a 60, 35 a 55°C.

20 Un polímero de ácido láctico es generalmente “bio-reabsorbible”, lo que significa que el polímero se descompone en oligómeros en una reacción hidrolítica lenta después del implantación o inyección en el cuerpo humano o en el cuerpo de un animal en contacto con los fluidos corporales. Los productos finales de la hidrólisis, tales como el ácido láctico o el ácido glicólico, se metabolizan en dióxido de carbono y agua. Otras expresiones intercambiables para la expresión “poliéster biorreabsorbible” que se usan con frecuencia son “poliéster reabsorbible”, “poliéster biodegradable” o “poliéster adsorbente”.

Revestimiento de polímero catiónico d)

25 La nanopartícula combinada comprende un revestimiento de polímero catiónico d) sobre el revestimiento de polímero de ácido láctico c) seleccionado del grupo de polietileniminas, quitosanos y péptidos derivados de lactoferrina humana con una longitud de 14-30 aminoácidos. Por lo tanto, un “revestimiento de polímero catiónico”, en el sentido de la invención, significará un revestimiento con un polímero, que contiene uno o más grupos catiónicos, respectivamente uno o más grupos laterales catiónicos, o uno o más grupos o uno o más grupos laterales que pueden volverse catiónicos (cargados positivamente) al menos en un cierto intervalo de pH, preferiblemente a un pH de 7,0 o inferior a 7,0.

30 Las partículas sólidas secas, que comprenden el núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el ingrediente activo b) revestido sobre él y el revestimiento de polímero de ácido láctico c), pueden dispersarse nuevamente en agua, y se puede añadir un polímero catiónico para el revestimiento de polímero catiónico d), con agitación e incubación durante al menos 10 o 10-30 minutos, para dar una segunda dispersión que comprende la nanopartícula combinada como contenido sólido. El contenido sólido de la segunda dispersión puede recogerse por centrifugación y redispersarse o secarse para dar como resultado una dispersión acuosa o una preparación seca que comprende la nanopartícula combinada.

Polietileniminas

40 Las polietileniminas pueden mostrar una función promotora de la absorción de células biológicas, lo que significa que cuando se administran simultáneamente con un ingrediente activo (ingrediente activo farmacéutico (API)), las polietileniminas facilitan y promueven la absorción del API en las células.

La polietilenimina con menor peso molecular parece proporcionar una mejor eficiencia de transfección, y parece tener una menor toxicidad para las células.

Una polietilenimina preferida puede tener un peso molecular (M_w) en el intervalo de 5,000 a 50,000, 20,000 a 30,000 g mol⁻¹.

45 Una persona experta conoce bien los métodos analíticos para determinar el peso molecular (M_w = peso molecular medio ponderal). En general, el peso molecular M_w puede determinarse mediante cromatografía de permeación en gel o mediante un método de dispersión de luz (véase, por ejemplo, H.F. Mark et al., Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2ª edición, vol. 10, páginas 1 y siguientes, J. Wiley, 1989).

Quitosano

50 El término quitosano incluirá todos los diferentes tipos de quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal de D-glucosamina enlazada β -(1-4) y N-acetil-D-glucosamina distribuidas aleatoriamente. El quitosano se puede obtener de las gambas u otros caparzones de crustáceos mediante tratamiento con hidróxido de sodio alcalino.

Un quitosano adecuado puede ser un quitosano de bajo peso molecular, preferiblemente con un peso molecular (M_w) de aproximadamente 20.000 a 250.000, más preferiblemente 40.000 a 200.000 dalton. Esto tiene la ventaja de

que el tamaño de las nanopartículas resultantes puede dirigirse a un tamaño más pequeño. Un quitosano adecuado puede acetilarse en un grado de 50 a 100, preferiblemente 70 - 90%.

Péptido derivado de lactoferrina humana (HLf).

5 Los péptidos derivados de lactoferrina humana pueden mostrar una función biológica de penetración celular (péptido de penetración celular (CPP), por ejemplo los documentos WO 2007/048599 o WO 2007/076904A1), lo que significa que cuando se administra simultáneamente con un ingrediente farmacéutico activo (API) a células humanas, los péptidos derivados de lactoferrina humana facilitan y promueven la absorción del API en las células.

10 El péptido derivado de lactoferrina humana puede mostrar una secuencia de aminoácidos que se encuentra con una similitud de al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100% con la secuencia de aminoácidos de la proteína de lactoferrina humana nativa dentro de la región de secuencia que codifica su función de penetración celular.

El péptido derivado de lactoferrina humana es un polímero catiónico que contiene uno o más aminoácidos con grupos laterales que pueden volverse catiónicos (cargados positivamente en un entorno acuoso) al menos a pH 7 o por debajo de pH 7 (por ejemplo, arginina (R) o lisina (K)). El propio péptido derivado de lactoferrina humana no es considerado como un ingrediente activo en el sentido de la invención.

15 El péptido derivado de lactoferrina humana puede tener una longitud de 14 a 30, 19 a 30, 20 a 25, 21 a 23 o 22 aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del péptido derivado de lactoferrina humana puede incluir al menos dos o dos restos de cisteína.

20 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del péptido derivado de lactoferrina humana puede incluir al menos dos o dos restos de cisteína que pueden formar un puente interno de cisteína-cisteína (puente de cistina). Preferiblemente, dos restos de cisteína están presentes en forma oxidada, formando un puente interno de cistina.

Un péptido derivado de lactoferrina humana adecuado puede tener una longitud de 14 a 30, 19 a 30, 20 a 25, 21 a 23 o 22 aminoácidos, y puede contener al menos 4, al menos 6, 4 a 8, 5 a 7 o 6 aminoácidos con, a pH inferior o igual a 7, cadenas laterales cargadas positivamente, prefiriéndose arginina y/o lisina.

25 Un péptido derivado de lactoferrina humana adecuado puede tener una longitud de 14 a 30, 19 a 30, 20 a 25, 21 a 23 o 22 aminoácidos, y puede incluir una secuencia de aminoácidos según SEQ.ID.No.1 KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR, o un secuencia que no difiere en más de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 posiciones de aminoácidos de la secuencia SEQ.ID.No.1.

30 El término "difiere en una posición de aminoácidos" debe entenderse en el sentido de que, en comparación con la secuencia SEQ.ID.No.1, hay un aminoácido diferente presente en una determinada posición, o no hay un aminoácido en cierta posición, o hay un aminoácido adicional presente dentro de la secuencia o añadido a la secuencia, o cualquier combinación de estos casos.

35 Lo más preferible, el péptido derivado de lactoferrina humana no difiere en más de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 posiciones de aminoácidos de la secuencia SEQ.ID.No.1, en el que están presentes al menos dos cisteína o dos restos de cisteína, preferiblemente están presentes dos cisteínas de acuerdo con las posiciones 2 y 19 de SEQ.ID.No.1. Preferiblemente, los restos de cisteína están presentes en forma oxidada, formando un puente interno de cisteína-cisteína (puente de cistina).

40 El péptido derivado de lactoferrina humana puede ser preferiblemente un péptido con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ.ID.No.1 KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR, o una secuencia que es al menos 80 o 90% homóloga a esa secuencia. Preferiblemente, están presentes los restos de cisteína en las posiciones 2 y 19 de SEQ.ID.No.1, o en posiciones similares o correspondientes.

Composición farmacéutica

La solicitud describe además una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula, que es una nanopartícula combinada como se explicó anteriormente.

Procedimiento para preparar una nanopartícula combinada

45 La solicitud describe además un procedimiento para preparar la nanopartícula inventiva, respectivamente la nanopartícula combinada.

50 El procedimiento para preparar una nanopartícula combinada se lleva a cabo por cuanto el núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) se prepara mezclando una disolución acuosa que comprende iones de calcio con una disolución acuosa que comprende iones de fosfato, preferiblemente durante al menos 1 o 1 - 3, o 1 - 60 segundos, con la adición del ingrediente activo b) antes, durante o preferiblemente después del mezclamiento, para dar un núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el revestimiento de ingrediente activo b). Una disolución acuosa que comprende iones de calcio puede ser una disolución acuosa que comprende sales de calcio solubles en agua, por ejemplo cloruro de calcio (CaCl₂), L-lactato de calcio (Ca(CH₃-HCOH-COO)₂) o nitrato de calcio (Ca(NO₃)₂). Una

disolución acuosa que comprende iones de fosfato puede ser una disolución acuosa que comprende una sal de fosfato soluble en agua, por ejemplo hidrogenofosfato de sodio (Na_2HPO_4) o hidrogenofosfato de di-amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).

5 Las dos disoluciones acuosas se pueden juntar primero en un adaptador en Y, preferiblemente con una longitud de 5 a 20 mm, en el que las disoluciones mixtas pueden tener un tiempo de residencia (nucleación) de al menos 1 o 1 - 3, o 1 - 60, preferiblemente a caudales de 10 a 30 $\mu\text{l/s}$, antes de que se mezclen continuamente (por ejemplo, con un Vortex®).

Preferiblemente, la disolución acuosa que comprende iones de calcio no comprende iones de fosfato. Preferiblemente, la disolución acuosa que comprende iones de fosfato no comprende iones de calcio.

10 El ingrediente activo, preferiblemente un ingrediente activo soluble en agua, tal como un péptido, una proteína, un ADN o un ARN, un ARNip, (ARN interferente pequeño) puede añadirse ya a una o a ambas disoluciones acuosas que comprenden iones de calcio o iones de fosfato, antes, durante o después del mezclado de estas disoluciones.

15 La disolución acuosa mixta, que comprende iones de calcio e iones de fosfato y el ingrediente activo, puede usarse como la fase acuosa interna 1 (W1 = fase acuosa 1) para una emulsión de agua en aceite en agua (W1/O/W2) (O = fase de aceite, W2 = fase acuosa 2), en la que el polímero de ácido láctico para el revestimiento de polímero c) se añade en una disolución orgánica a una fase acuosa (W1), preferiblemente mediante tratamiento ultrasónico, para dar una emulsión de agua en aceite (W1/O) y en la que se añade la emulsión de agua en aceite (W1/O), a una fase acuosa adicional 2 (W2), preferiblemente a un exceso (volumen en exceso) de una fase acuosa adicional 2 (W2),
20 preferiblemente mediante tratamiento ultrasónico, para dar la emulsión de agua en aceite en agua (W1/O/W2), en la que se elimina el disolvente orgánico para dar una primera dispersión, en la que el contenido sólido de la primera dispersión se recoge, preferiblemente por centrifugación, se redispersa en agua y se seca para dar partículas sólidas, en el que las partículas sólidas secas se redispersan en agua y se añade con agitación un polímero catiónico para el revestimiento de polímero catiónico d), preferiblemente con un tiempo de incubación de al menos
25 10 minutos, para dar una segunda dispersión que comprende la nanopartícula combinada como contenido sólido, en la que el contenido sólido de la segunda dispersión puede recogerse por centrifugación y se puede volver a dispersar o se puede secar para dar como resultado una dispersión acuosa o una preparación seca que comprende la nanopartícula combinada.

Uso

30 La solicitud describe además el uso de la nanopartícula inventiva en un método de preparación de una composición farmacéutica adecuada para la administración oral o parenteral del ingrediente activo incluido en la nanopartícula.

Ejemplos

Materiales

35 PLGA = Poli(D,L-lactida-co-glicolida) 50:50 (Resmer® RG 502 H, $M_w = 7.000-17.000 \text{ g mol}^{-1}$, Evonik Industries AG (Darmstadt)). Polialcohol vinílico (PVA, $M_w = 30.000-70.000 \text{ g mol}^{-1}$, 87-90% hidrolizado), quitosano (bajo peso molecular, 75-85% desacetilado) y polietilenimina (PEI, $M_w = 25.000 \text{ g mol}^{-1}$) se adquirieron de Sigma-Aldrich. Para experimentos de silenciamiento génico con anti-ARNip de eGFP (eGFP = proteína fluorescente verde mejorada), se usó ARNip bicatenario desalinizado, de Invitrogen, Ambion® (Carlsbad, USA), sentido, 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUJCAU-3' (SEQ ID No,7), y antisentido, 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3' (SEQ ID No,8) ($M_w = 14.019,5 \text{ g mol}^{-1}$). Para los experimentos de transfección con ADN plasmídico, pcDNA3-eGFP, que codifica la proteína fluorescente mejorada (eGFP), se aisló de *Echerichia coli* usando un kit de ADN plasmídico libre de endotoxinas Nucleobond (Macherey-Nagel, Dueren, Alemania). Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y se usaron sin purificación adicional.

45 El péptido derivado de lactoferrina humana (HLf) usado en los ejemplos fue un péptido sintetizado con una secuencia de aminoácidos según la SEQ.ID.No.1 KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKR.

Instrumentos

Para la formación de emulsiones de agua en aceite y de agua en aceite en agua, la sonicación (ultrasónica) se llevó a cabo con un instrumento Hielscher UP50H, sonotrodo MS2, 70% de amplitud, pulso 0,7, durante 20 s. Las determinaciones de la dispersión dinámica de luz y del potencial zeta se realizaron con un instrumento de nanoestación Zetasizer (Malvern Nano-ZS, láser: $\lambda = 532 \text{ nm}$) usando la aproximación de Smoluchowski y tomando los datos del software Malvern sin corrección adicional. Los datos de los tamaños de partículas se refieren a distribuciones de intensidad de dispersión (promedio z). La microscopía de barrido confocal por láser se realizó con un microscopio de barrido confocal por láser (SP5 LCSM, Leica) con un objetivo de agua 63x. La centrifugación se realizó a 4°C con un instrumento Heraeus Fresco 21 (Thermo Scientific). Las eficiencias de transfección y silenciamiento génico se determinaron mediante espectroscopía de luz de transmisión y fluorescencia con un instrumento Carl Zeiss Axiovert 40 CFL. La viabilidad de las células se analizó mediante el ensayo de MTT mediante

análisis espectrofotométrico con un instrumento Multiscan FC (ThermoFisher scientific, Vantaa, Finlandia) a $\lambda = 570$ nm. La liofilización se realizó con un instrumento Christ, Alpha 2-4 LSC.

Resumen de ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio (CaP)-ingrediente activo de

5 Ejemplo 1a: Síntesis de nanopartículas de CaP-eGFP-ADN

Ejemplo 1b: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip

Ejemplo 2: Síntesis de nanopartículas de CaP-ingrediente activo-PLGA

Ejemplo 2a: Síntesis de nanopartículas de CaP-(FITC-BSA)-PLGA

Ejemplo 2b: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip

10 Ejemplo 2c: Síntesis de nanopartículas de CaP-eGFP-ADN-PLGA

Ejemplo 3: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip-PLGA-polímero catiónico

Ejemplo 3a: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip-PLGA-PEI

Ejemplo 3b: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip-PLGA-quitosano

Ejemplo 3c: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip-PLGA-HLf

15 Ejemplo 4: Captación celular (células HeLa)

Ejemplo 5: Silenciamiento génico

Solo los ejemplos que tienen:

20 a) un núcleo de nanopartículas de fosfato de calcio a), b) un revestimiento de ingrediente activo b) sobre el núcleo de nanopartículas de fosfato de calcio a), c) un revestimiento de polímero de ácido láctico c) sobre el revestimiento de ingrediente activo b), d) un revestimiento de polímero catiónico d) sobre el revestimiento de polímero de ácido láctico c) seleccionado del grupo de polietileniminas, quitosano y péptidos derivados de lactoferrina humana con una longitud de 14 a 30 aminoácidos están dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas de CaP-ingrediente activo

25 Las nanopartículas de fosfato de calcio se sintetizaron con un método de precipitación rápida. Los ácidos nucleicos se adsorben sobre la superficie de las nanopartículas de fosfato de calcio. Por lo tanto, el crecimiento de cristales se inhibe, y las nanopartículas de fosfato de calcio se estabilizan electrostáticamente. En este caso, el ADN o ARNip actúan tanto como ingrediente activo como agente estabilizador que protege la dispersión de la agregación.

Ejemplo 1a: Síntesis de nanopartículas de CaP-eGFP-ADN

30 Las disoluciones acuosas de nitrato de calcio (6,25 mM, 105 μ l) e hidrogenofosfato de diamonio (3,74 mM, 105 μ l) se mezclaron a través de un adaptador en Y en un reactor tubular con una bomba de jeringa y se bombearon con mezclamiento continuo (Vortex) en una disolución acuosa de eGFP-ADN (2,5 mg ml⁻¹, 40 μ l). El caudal de las disoluciones fue 16,6 μ l s⁻¹, y el tiempo de residencia (nucleación) en el adaptador Y (7 mm de longitud) fue 1,3 s. Después de la precipitación completa, la dispersión de las nanopartículas (núcleo: fosfato de calcio; cubierta: ácido nucleico) se enfrió con hielo y se usó después de 5 minutos de incubación para el encapsulamiento en

35 nanopartículas de PLGA.

Ejemplo 1b: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip

40 Las disoluciones acuosas de nitrato de calcio (6,25 mM, 105 μ l) e hidrogenofosfato de diamonio (3,74 mM, 105 μ l) se mezclaron a través de un adaptador en Y en un reactor tubular con una bomba de jeringa, y se bombearon con mezclamiento continuo (Vortex) en una disolución de anti-eGFP-ARNip (3,9 mg ml⁻¹, 40 μ l). El caudal de ambas disoluciones fue 16,6 μ l s⁻¹, y el tiempo de residencia (nucleación) en el adaptador Y (7 mm de longitud) fue 1,3 s. Después de la precipitación completa, la dispersión de las nanopartículas (núcleo: fosfato de calcio; cubierta: ácido nucleico) se enfrió con hielo y se usó después de 5 minutos de incubación para el encapsulamiento en nanopartículas de PLGA.

Ejemplo 2: Síntesis de nanopartículas de CaP-ingrediente activo-PLGA

45 Para proteger la capa externa de ADN o ARNip de enzimas degradantes como las DNAsas o RNAsas, y para proporcionar un perfil de liberación sostenida a las partículas, las nanopartículas de fosfato de calcio-ADN o fosfato

de calcio-ARNip se encapsularon entonces en una matriz de PLGA en los ejemplos 2b respectivamente 2c. La dispersión acuosa de fosfato de calcio-ADN o fosfato de calcio-ARNip se usó como la fase acuosa interna (W1) en el proceso de emulsión. El polímero se disolvió en diclorometano (O). La sonicación conduce a la emulsión primaria W1/O con pequeñas gotas de agua (que contienen las nanopartículas de fosfato de calcio) en la fase oleosa. La adición a la fase continua de agua (PVA en agua) y la sonicación posterior conducen a una emulsión estable W1/O/W2. La evaporación del disolvente orgánico a presión reducida produce una dispersión casi transparente.

Ejemplo 2a: Síntesis de nanopartículas de CaP-(FITC-BSA)-PLGA

Las nanopartículas deben marcarse con FITC-BSA (seroalbúmina de bovina marcada con isotiocianato de fluoresceína) para mostrar la absorción celular de las nanopartículas por fluorescencia. Por lo tanto, para la funcionalización con la molécula marcadora FITC-BSA, se precipitó fosfato de calcio durante el proceso de emulsión en la emulsión W1/O primaria. Esto fue necesario porque FITC-BSA se adsorbe a las nanopartículas de fosfato de calcio pero no las estabiliza coloidalmente (a menos que sea ADN o ARN).

Se prepararon dos emulsiones W1/O (A y B) en una primera etapa. La emulsión A contenía la disolución de sal de fosfato y la biomolécula en las gotas de agua internas, y se disolvió PLGA en la fase orgánica. La emulsión B contenía la disolución de sal de calcio en la fase acuosa interna y también PLGA disuelto en la fase orgánica. El mezclamiento de ambas emulsiones con sonicación condujo a la precipitación de fosfato de calcio en las gotas de agua internas. La adición de las emulsiones W1/O combinadas en la fase continua de agua (PVA en agua) y la sonicación condujeron a una emulsión W1/O/W2 estable. La evaporación del disolvente orgánico a presión reducida dio una dispersión amarilla casi transparente. Con este método, el crecimiento de cristales estaba limitado por el pequeño volumen de la gota de agua (microrreactor) en el disolvente orgánico.

Las nanopartículas de fosfato de calcio-FITC-BSA-PLGA se sintetizaron mediante un método de evaporación de disolvente de emulsión W1/O/W2. Primero, se prepararon dos emulsiones W/O (A y B) por ultrasonidos. Para la emulsión A, se disolvieron 625 μg de FITC-BSA en 125 μl de una disolución 10 mM de Na_2HPO_4 . Esto se dispersó en una disolución de PLGA en diclorometano (13,3 mg ml^{-1} , 375 μl). Para la emulsión B, se disolvieron 625 μg de FITC-BSA en 125 μl de una disolución 1,25 M de CaCl_2 (1,25 M, 125 μl). Esto se dispersó en una disolución de PLGA en diclorometano (13,3 mg ml^{-1} , 375 μl). Luego, las emulsiones A y B se mezclaron por sonicación (10 s) para formar la emulsión C. Esta emulsión W1/O se añadió luego gota a gota a la fase acuosa continua (3 ml), que contenía 30 mg de PVA como dispersante, y se sonicó nuevamente (sonotrodo) para formar una emulsión amarilla, lechosa W1/O/W2. Después de eliminar el diclorometano a presión reducida (200-600 mbares), las nanopartículas de fosfato de calcio-FITC-BSA se incorporaron a la partícula de PLGA. Se eliminó un exceso de PVA y FITC-BSA por centrifugación (30 minutos a 14.800 rpm) y redispersión de las partículas en agua ultrapura durante tres veces por sonicación (sonotrodo). Para determinar la eficiencia del encapsulamiento de FITC-BSA, los sobrenadantes se analizaron mediante espectroscopía UV/Vis a 460 nm después de la calibración previa con FITC-BSA disuelto. La dispersión resultante se congeló súbitamente en nitrógeno líquido y finalmente se liofilizó durante 72 h a 0,31 mbares y -10 C. Las partículas fueron fácilmente redispersables en agua mediante agitación suave.

Las nanopartículas de fosfato de calcio-PLGA contenían 5% de fosfato de calcio según lo determinado por espectroscopía de absorción atómica (calculada a partir del contenido de calcio).

Ejemplo 2b: Síntesis de nanopartículas de CaP-anti-eGFP-ARNip-PLGA

Para el encapsulamiento de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con anti-eGFP-ARNip en nanopartículas de PLGA, se aplicó un método de evaporación de disolvente de emulsión doble de agua en aceite en agua (W1/O/W2). A una disolución de 10 mg de PLGA disuelto en 750 μl de diclorometano, se añadieron 250 μl de la dispersión de nanopartículas de fosfato de calcio/ácido nucleico del ejemplo 1b. Después, se añadió una disolución de 200 μg de seroalbúmina bovina (BSA) acetilada libre de RNasa en 40 μl de agua como dispersante. La mezcla se sonicó (sonotrodo, 15 s) para formar la emulsión primaria W1/O blanca lechosa. La emulsión W1/O se vertió inmediatamente entonces en la fase acuosa continua (3 ml), que contenía 30 mg de alcohol polivinílico (PVA) como dispersante, y se volvió a ultrasonificar (sonotrodo, 15 s).

Finalmente, las nanopartículas de PLGA se precipitaron después de eliminar el diclorometano a presión reducida (200-600 mbares) en un evaporador giratorio. De este modo, las nanopartículas de fosfato de calcio que portaban ARNip se incorporaron a una matriz nanoparticulada de PLGA. El exceso de PVA se eliminó mediante centrifugación (30 minutos a 14.800 rpm) y redispersión de las partículas en agua ultrapura durante tres veces. Para determinar la eficiencia del encapsulamiento de los ácidos nucleicos, los sobrenadantes restantes se analizaron por espectroscopía UV/Vis a 260 nm de acuerdo con protocolos estándar. La dispersión resultante se congeló súbitamente en nitrógeno líquido y finalmente se liofilizó durante 72 h a 0,31 mbares y -10°C. Las partículas eran fácilmente redispersables en agua por agitación suave.

Ejemplo 2c: Síntesis de nanopartículas de CaP-eGFP-ADN-PLGA

Para el encapsulamiento de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con eGFP-ADN en nanopartículas de PLGA, se aplicó un método de evaporación de disolvente de emulsión doble de agua en aceite en agua

(W1/O/W2). A una disolución de 10 mg de PLGA disuelto en 750 μ l de diclorometano, se añadieron 250 μ l de la dispersión de nanopartículas de fosfato de calcio/ácido nucleico del ejemplo 1a. Después, se añadieron 40 μ l de una disolución de 20 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) acetilada libre de RNasa en agua como dispersante. La mezcla se sonicó (sonotrodo, 15 s) para formar la emulsión primaria W1/O blanca lechosa. La emulsión W1/O se vertió inmediatamente entonces en la fase acuosa continua (3 ml), que contenía 30 mg de alcohol polivinílico (PVA) como dispersante, y se sonicó nuevamente (sonotrodo, 15 s).

Finalmente, las nanopartículas de PLGA se precipitaron después de eliminar el diclorometano a presión reducida (200-600 mbares) en un evaporador giratorio. De este modo, las nanopartículas de fosfato de calcio que llevan ADN se incorporaron a una matriz nanoparticulada de PLGA. El exceso de PVA se eliminó mediante centrifugación (30 minutos a 14.800 rpm) y redispersión de las partículas en agua ultrapura durante tres veces. Para determinar la eficiencia del encapsulamiento de los ácidos nucleicos, los sobrenadantes restantes se analizaron por espectroscopía UV/Vis a 260 nm de acuerdo con protocolos estándar. La dispersión resultante se congeló súbitamente en nitrógeno líquido y finalmente se liofilizó durante 72 h a 0,31 mbares y -10°C. Las partículas eran fácilmente redispersables en agua por agitación suave.

5 **Ejemplo 3: Síntesis de nanopartículas de CaP-ARNip-PLGA-polímero catiónico**

Para mejorar la absorción celular de las nanopartículas de fosfato de calcio-PLGA, la carga superficial puede revertirse mediante la deposición capa por capa de polímeros catiónicos como quitosano, PEI y HLf. Además, los polímeros (quitosano y PEI) son capaces de inducir el efecto de esponja protónica. Esto conduce a un escape endosómico mejorado de las nanopartículas y a una mayor eficacia terapéutica. Como se muestra en las medidas de potencial zeta, la carga superficial de las nanopartículas de fosfato de calcio-PLGA podría revertirse fácilmente mediante la deposición capa por capa de polímeros catiónicos de aproximadamente -24 mV a +50 mV (quitosano), a +31 mV (PEI) o +10 mV (HLf). Las imágenes SEM de partículas de CaP-ARNip-PLGA modificadas con HLf muestran nanopartículas esféricas. El tamaño y la morfología de las nanopartículas no cambiaron significativamente.

15 **Ejemplo 3a: Síntesis de nanopartículas de CaP-ARNip-PLGA-PEI**

25 Se resuspendieron 1,5 mg de las partículas liofilizadas del ejemplo 2b en 1 ml de agua ultrapura y se añadieron gota a gota a una disolución acuosa de PEI (2 mg en 1 ml) con agitación continua. Después de 30 minutos de agitación continua a temperatura ambiente, la dispersión se purificó tres veces por centrifugación (30 minutos a 14.800 rpm) y redispersión (agitación, no es necesaria sonicación) en agua ultrapura. Para los experimentos de cultivo celular, las partículas finalmente se redispersaron en el medio de cultivo celular.

30 **Ejemplo 3b: Síntesis de nanopartículas de CaP-ARNip-PLGA-quitosano**

35 Se resuspendieron 1,5 mg de las partículas liofilizadas del ejemplo 2b en 1 ml de agua ultrapura y se añadieron gota a gota a una disolución acuosa de quitosano (5 mg en 1 ml, pH ajustado a 5 con ácido acético) con agitación continua. Después de 30 minutos de agitación continua a temperatura ambiente, la dispersión se purificó tres veces por centrifugación (30 minutos a 14.800 rpm) y redispersión (agitación, no es necesaria sonicación) en agua ultrapura. Para los experimentos de cultivo celular, las partículas finalmente se redispersaron en el medio de cultivo celular.

40 **Ejemplo 3c: Síntesis de nanopartículas de CaP-ARNip-PLGA-HLf**

Se resuspendieron 3 mg de partículas liofilizadas del ejemplo 2b en 3 ml de agua ultrapura y se añadieron en 3 ml (2 mg/ml) de disolución de lacto ferrina humana durante 2 h, con agitación continua. Las partículas tratadas se liofilizaron. Para los experimentos de cultivo celular, las partículas se redispersaron y purificaron en agua ultrapura y por centrifugación (30 minutos a 14.800 rpm), y finalmente se redispersaron en el medio de cultivo celular.

45 **Ejemplo 4: captación celular (HeLa)**

Las células HeLa se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, penicilina 100 U ml⁻¹ y estreptomycin 100 U ml⁻¹ a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

50 Los experimentos de absorción celular se realizaron con células, que se sembraron y cultivaron en placas de 8 pocillos durante 24 h antes de su uso. Se añadieron a las células disolución de nanopartículas de CaP-(FITC-BSA)-PLGA (sin modificar (ejemplo 2b), modificada con quitosano, PEI o HLf (ejemplo 3)) durante 1 hora y 3 horas. Para la microscopía de fluorescencia, el núcleo celular se coloreó con DAPI. Las imágenes del microscopio de fluorescencia muestran claramente que las nanopartículas de CaP-(FITC-BSA)-PLGA modificadas fueron absorbidas eficientemente por las células HeLa. Mientras que las nanopartículas de CaP-(FITC-BSA)-PLGA modificadas con PEI se acumularon eficientemente después de 1 hora, la absorción de nanopartículas de CaP-(FITC-BSA)-PLGA modificadas con quitosano o con HLf se pudo mostrar eficientemente después de 3 horas.

55 Para los experimentos de colocalización, las células HeLa se sembraron en placas de 8 pocillos (Lab-Tek) y se cultivaron durante 24 h. Después, las células HeLa se transfectaron con 50 ng de ADN plasmídico de Lamp1-RFP y 0,3 μ l de Lipofectamine 2000 (Life technology) según las instrucciones del fabricante. Después de 4 h, se cambió el

medio de cultivo celular y las células se lavaron varias veces con disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). Después de 16 h adicionales, las células se trataron con la dispersión de nanopartículas (20 μl , 1 mg de nanopartículas ml^{-1}) y se examinaron con un microscopio de barrido láser confocal en diferentes puntos de tiempo.

5 Los estudios de captación celular de nanopartículas de fosfato de calcio-(FITC-BSA)-PLGA y los experimentos de colocalización con células HeLa que expresan Lamp1-RFP mostraron que las nanopartículas fueron absorbidas de manera eficiente por las células. Las nanopartículas con una carga superficial negativa tenían una baja afinidad por la membrana celular y solo se absorbieron moderadamente, mientras que las nanopartículas con una carga superficial positiva (nanopartículas funcionalizadas con quitosano o PEI) cubrieron la membrana celular después de 10 1 h de incubación debido a interacciones electrostáticas de la membrana celular cargada negativamente y la superficie catiónica de las nanopartículas. Además, la mayoría de las nanopartículas de fosfato de calcio-(FITC-BSA)-PLGA con carga negativa terminaron en el endosoma como se muestra por la colocalización de Lamp1-RFP y la fluorescencia verde de FITC-BSA. Por el contrario, las nanopartículas de fosfato de calcio-(FITC-BSA)-PLGA funcionalizadas con quitosano y con PEI (carga superficial positiva) indujeron el efecto de esponja protónica y escaparon del endosoma como se muestra por una fluorescencia verde difusa en el citosol después de 3 h de 15 incubación.

Ejemplo 5: silenciamiento génico

Las células HeLa-eGFP (células HeLa genéticamente modificadas que expresaron proteína verde fluorescente mejorada, eGFP) se cultivaron en DMEM suplementado con FCS al 10% (suero de ternera fetal), penicilina 100 U ml^{-1} , estreptomycin 100 U ml^{-1} , y geneticina 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 37°C y atmósfera de 5% de CO_2 . 12 h antes de la adición de las nanopartículas, las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 2,5·10⁴ células por pocillo. 20

Antes de la transfección, el medio de cultivo celular fue reemplazado por las nanopartículas redispersadas en medio de cultivo celular reciente (0,1 mg de nanopartículas en 0,5 ml correspondientes a 0,8 μg - 1 μg de ARNip por pocillo). Después de la incubación durante 7 h, el medio de transfección se reemplazó por medio de cultivo celular reciente. La eficacia del silenciamiento génico se midió 72 h después de la adición de las nanopartículas por 25 microscopía de luz y microscopía de fluorescencia.

Como control, las células se transfectaron con Lipofectamine™ 2000 según lo recomendado por el fabricante. En resumen, 50 μl de DMEM (sin FCS) se mezclaron con 1 μl de Lipofectamine™ 2000 y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió anti-eGFP-ARNip (20 pmoles, 0,28 μg) a 50 μl de DMEM (sin FCS). 30 Después, ambas disoluciones se mezclaron e incubaron durante 20 minutos antes de que se añadieran a cada pocillo 100 μl de esta disolución y adicionalmente 400 μl de DMEM. Después de la incubación durante 7 h, el medio de transfección se reemplazó por medio de cultivo celular reciente.

Las eficiencias de los experimentos de silenciamiento génico con nanopartículas de fosfato de calcio-PLGA funcionalizadas con anti-eGFP-ARNip se calcularon a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia y se 35 calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{\text{células que no fluorescenas la transfección}[\%] - \text{células que no fluorescen en control}[\%]}{\text{células que fluorescen en control}[\%]} * 100$$

Las células HeLa-eGFP cultivadas en las mismas condiciones pero sin ningún tratamiento se utilizaron como control.

Las nanopartículas de fosfato de calcio-PLGA funcionalizadas con anti-eGFP-ARNip atenuaron eficientemente el gen que codifica eGFP en células HeLa que expresan eGFP. Las nanopartículas catiónicas de fosfato de calcio-PLGA-ARNip revestidas con quitosano, PEI o HLf mostraron eficiencias de silenciamiento génico de 28, 50 o 51% respectivamente. De acuerdo con los experimentos de transfección, la vitalidad de las células después del tratamiento con nanopartículas de fosfato de calcio-PLGA estaba en el intervalo o incluso mayor en comparación con los agentes de transfección liposomiales tal como Lipofectamine®. Las nanopartículas catiónicas de fosfato de calcio-PLGA-ARNip revestidas con quitosano, PEI o HLf mostraron una buena viabilidad celular, aunque PEI es 45 conocida por su citotoxicidad. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

	Diámetro (Máximo en la distribución de tamaños de nanopartículas mediante DLS (en número)) [nm]	Índice de polidispersidad mediante DLS	Potencial zeta mediante DLS [mV]	Viabilidad celular [%]	Eficiencia del silenciamiento génico [%]
Lipofectamine	--	--	--	73	74
CaP-ARNip-PLGA	105	0,35	-25	80	22
CaP-ARNip-PLGA-quitosano	106	0,42	+52	85	28
CaP-ARNip-PLGA-PEI	91	0,38	+32	72	50
CaP-ARNip-PLGA-HLf	122	0,60	+3	76	51

Listado de secuencias

- 5 <110> Evonik Röhm GmbH
 <120> Nanopartícula
 <130> 2013P00376WO
 <150> EPEP14170333
 <151> 2014-05-28
- 10 <160> 8
 <170> BiSSAP 1.2
 <210> 1
 <211> 22
 <212> PRT
- 15 <213> Sintético
 <220>
 <223> idéntico a SEQ ID No. 3 en el documento WO 2007/048599
 <400> 1
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20
- 20 <210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sintético
 <220>

ES 2 767 501 T3

< 223> SEQ ID No. 4 en el documento WO 2007/048599

<400> 2

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15
Ser Cys

<210> 3

5 < 211> 16

< 212> PRT

< 213> Sintético

<220>

< 223> SEQ ID No. 5 en el documento WO 2007/048599

10 <400> 3

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 4

< 211> 11

< 212> PRT

15 < 213> Sintético

<220>

< 223> SEQ ID No. 6 en el documento WO 2007/048599

<400> 4

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

20 <210> 5

< 211> 22

< 212> PRT

< 213> Sintético

<220>

25 < 223> SEQ ID No. 29 en el documento WO 2007/048599

<400> 5

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
1 5 10 15
Ile Thr Cys Val Arg Arg
20

<210> 6

< 211> 18

30 < 212> PRT

< 213> Sintético

<220>

< 223> SEQ ID No. 30 en el documento WO 2007/048599

ES 2 767 501 T3

<400> 6

Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile
1 5 10 15
Thr Cys

<210> 7

< 211> 22

5

< 212> ARN

< 213> Sintético

<220>

< 221> fuente

< 222> 1..22

10

< 223> /tipo_mol="otro ARN" /nota="anti-eGFP-ARNip, sentido" /organismo="Sintético"

<400> 7

gcaagcugac ccugaaguuc au 22

<210> 8

< 211> 22

15

< 212> ARN

< 213> Sintético

<220>

< 221> fuente

< 222> 1..22

20

< 223> /tipo_mol="otro ARN" /nota="anti-eGFP-ARNip, antisentido" /organismo="Sintético"

<400> 8

augaacuca gggucagcuu gc 22

25

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula con un diámetro, que es el máximo en la distribución de tamaños de nanopartículas, en el intervalo de 10 - 300 nm, que comprende
- 5 a) un núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a),
 b) un revestimiento de ingrediente activo b) sobre el núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a),
 c) un revestimiento de polímero de ácido láctico c) sobre el revestimiento de ingrediente activo b),
 d) un revestimiento de polímero catiónico d) sobre el revestimiento de polímero de ácido láctico c) seleccionado del grupo de polietileniminas, quitosano y péptidos derivados de lactoferrina humana con una longitud de 14 a 30 aminoácidos.
- 10 2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que el ingrediente activo es un péptido, una proteína o un ácido nucleico.
3. Nanopartícula según la reivindicación 1 o 2, en la que el ingrediente activo es un ARNip.
4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el péptido derivado de lactoferrina humana es un péptido con la secuencia de aminoácidos según SEQ.ID.No.1 KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKR o
 15 una secuencia que no difiere en más de 8 posiciones de aminoácidos de SEQ.ID.No.1.
5. Nanopartícula según la reivindicación 4, en la que en la secuencia de aminoácidos del péptido derivado de lactoferrina humana están presentes al menos dos restos de cisteína.
6. Composición farmacéutica que comprende una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Procedimiento para preparar una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el núcleo
 20 de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el revestimiento de ingrediente activo b) sobre él se prepara mezclando una disolución acuosa que comprende iones de calcio y una disolución acuosa que comprende iones de fosfato, en el que se añade un ingrediente activo para dar un núcleo de nanopartícula de fosfato de calcio a) con el revestimiento del ingrediente activo b), que se usa como la fase de agua interna (W1) para una emulsión de agua en aceite en agua (W1/O/W2), en el que el polímero de ácido láctico para el revestimiento de polímero c) se añade en
 25 una disolución orgánica a la fase acuosa (W1) para dar una emulsión de agua en aceite (W1/O), y en el que la emulsión de agua en aceite (W1/O) se añade a otra fase de agua (W2) para dar la emulsión de agua en aceite en agua (W1/O/W2), en el que el disolvente orgánico se elimina para dar una primera dispersión, en el que el contenido sólido de la primera dispersión se recoge, se vuelve a dispersar en agua y se seca para dar partículas sólidas, en el que las partículas sólidas secas se vuelven a dispersar en agua y se añade un polímero catiónico para el
 30 revestimiento de polímero catiónico d) con agitación para dar una segunda dispersión que comprende la nanopartícula como contenido sólido, en el que el contenido sólido de la segunda dispersión se recoge por centrifugación o filtración de flujo tangencial y se vuelve a dispersar o se seca para dar como resultado una dispersión acuosa o una preparación seca que comprende la nanopartícula.
8. Uso de una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un método de preparación de una
 35 composición farmacéutica adecuada para el suministro oral o parenteral del ingrediente activo incluido en la nanopartícula combinada.