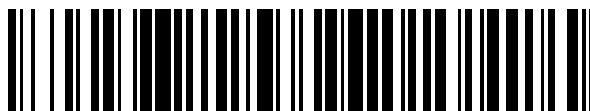


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 449**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

C08K 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2015** **PCT/EP2015/073782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016** **WO16059114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2015** **E 15780861 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3207148**

54 Título: **Método para transfectar células eucarióticas usando fibras de sepiolita**

30 Prioridad:

14.10.2014 EP 14306619

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

11.12.2020

73 Titular/es:

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (100.0%)
39, rue Camille Desmoulins
94805 Villejuif Cédex, FR

72 Inventor/es:

CASTRO SMIRNOV, FIDEL ANTONIO;
LOPEZ, BERNARD;
RUIZ HITZKY, EDUARDO y
ARANDA GALLEG0, PILAR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 798 449 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

Método para transfectar células eucariotas usando fibras de sepiolita

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para transfectar células eucariotas *in vitro* o *ex vivo* con uno o más ácidos nucleicos, usando una composición de transfección que contiene uno o más materiales compuestos que comprenden fibras de sepiolita y uno o más cationes polivalentes.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que contiene, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, dicho material compuesto y uno o más cationes polivalentes.

Antecedentes y descripción general de la invención

10 La transfección se refiere a un proceso que consiste en introducir deliberadamente un ácido nucleico funcional biológico en el núcleo de una célula eucariota. El ácido nucleico extraño entonces se expresa y retiene sus funciones dentro de la célula.

Este proceso conduce a una transfección estable, cuando el ácido nucleico extraño se integra en el genoma de la célula, o a una transfección transitoria, cuando el ácido nucleico extraño se expresa por un tiempo limitado.

15 La transferencia de ácidos nucleicos particulares a organismos biológicos es un tema fundamental para diseñar nuevas estrategias prometedoras para la terapia génica y/o el desarrollo de nuevos modelos biológicos de interés tanto para la investigación académica y biológica/biotecnológica, médica y de agronomía aplicada.

Se ha desarrollado una amplia gama de sistemas de administración no virales que conducen a métodos de transfección tanto químicos como físicos.

20 Los métodos comunes de transfección física incluyen electroporación, hidroporación, sonoporación, tecnología biolística, micro/nanoinyección y láser/optoinyección. Estos métodos normalmente emplean una fuerza física para vencer la barrera de membrana de las células y así facilitar la transferencia intracelular de ácidos nucleicos. La aplicación de estos métodos es bastante simple, ya que el ácido nucleico se introduce en la célula sin involucrar a un vehículo particular o un sistema viral. Sin embargo, estos métodos requieren equipos caros. También requieren mucho tiempo e inducen varios inconvenientes, incluyendo la mortalidad celular y los daños en los tejidos. Además, las perspectivas de administración *in vivo* son pobres.

30 Los métodos de transfección química normalmente se basan en el uso de interacciones electrostáticas entre compuestos catiónicos y el esqueleto cargado negativamente de ácidos nucleicos. Por lo tanto, los reactivos de transfección se componen comúnmente de liposomas catiónicos y polímeros catiónicos, que forman complejos electrostáticos con los ácidos nucleicos. Aunque estos métodos no requieren un equipo en particular, sus reactivos siguen siendo caros y sus aplicaciones no son completamente satisfactorias. De hecho, estos métodos comprenden generalmente varias etapas que pueden ser difíciles de controlar, y su eficiencia depende del tipo de célula. Además, requieren mucho tiempo, son difíciles de reproducir y pueden volverse tóxicos a altas concentraciones.

35 Por lo tanto, existe una necesidad real de proporcionar un método de transfección no viral que supere los inconvenientes mencionados anteriormente. El método debe ser económico, fácil de reproducir e inducir una alta eficiencia de transfección.

El método también desencadenará transfección estable y transitoria y será adecuado para los tipos de células eucariotas.

40 El solicitante ha descubierto ahora, sorprendentemente, que podría lograrse una transfección eficaz de células eucariotas usando un material compuesto que comprende fibras inorgánicas particulares que están unidas con los ácidos nucleicos a transfectar en la célula.

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para transfectar células eucariotas *in vitro* o *ex vivo* con uno o más ácidos nucleicos en donde dichas células se ponen en contacto con una composición de transfección que contiene uno o más materiales compuestos que comprenden fibras de sepiolita, que tienen una longitud media menor o igual a 2 µm, unida a dichos ácidos nucleicos y uno o más polivalentes cationes.

El método de la invención permite alcanzar los objetivos descritos anteriormente.

El método de transfección según la invención no requiere un equipo costoso particular.

50 El solicitante ha descubierto que las fibras de sepiolita particulares usadas en la presente invención se internalizan espontáneamente y rápidamente en las células eucariotas, y en particular en las células de mamíferos. El método de transfección según la invención, por lo tanto, no consume mucho tiempo.

Además, el solicitante ha descubierto, sorprendentemente, que el método de transfección según la invención permite la internalización nuclear de los ácidos nucleicos.

El método según la invención desencadena la transfección estable y transitoria de diferentes tipos de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células eucariotas.

- 5 Además, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Directiva Europea consideran que las fibras de sepiolita particulares utilizadas en la invención no son peligrosas ni cancerígenas. El método de la invención constituye un enfoque prometedor para la terapia génica, en particular para el tratamiento de trastornos genéticos, enfermedades cardiovasculares, SIDA y cáncer.

- 10 Por lo tanto, un primer tema de la presente invención es un método no terapéutico para transfectar células eucariotas *in vitro* o *ex vivo* con uno o más ácidos nucleicos en donde dichas células se ponen en contacto con una composición de transfección que contiene uno o más materiales compuestos que comprenden fibras de sepiolita, que tienen una longitud media menor o igual a 2 μm , unida a dichos ácidos nucleicos y uno o más polivalentes cationes

De manera similar, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, dicho material compuesto y uno o más cationes polivalentes.

- 15 Otros temas, características, aspectos y ventajas de la invención surgirán aún más claramente al leer la descripción y los ejemplos que siguen.

En lo que sigue y, a menos que se indique lo contrario, los límites de un intervalo de valores se incluyen dentro de este intervalo, en particular en las expresiones "de entre" y "que van de ... a ...".

Además, la expresión "al menos uno" utilizada en la presente descripción es equivalente a la expresión "uno o más".

20 Figuras

La figura 1 muestra la eficacia del método de transfección de la presente invención en células de hámster V79 (1A y 1B). Las células V79 se transfectaron con materiales compuestos que comprenden fibras de sepiolita (1A) o fibras de sepiolita sonicadas (1B) unidas con el gen resistente a G418, en presencia de CaCl_2 .

- 25 La figura 2 muestra la eficacia del método de transfección de la presente invención en presencia de diferentes cationes polivalentes, Mg^{2+} (2A, izquierda), Ca^{2+} (2A, derecha y 2B, 1-2), espermidina (2B, 3-4) y espermina (2B, 5-6), en células de hámster V79.

- 30 La Figura 3 muestra la eficacia del método de transfección de la presente invención usando fibras de sepiolita sonicadas en células humanas U2OS. Las células U2OS pretratadas con cloroquina (3B) se compararon con las células no tratadas (3A). Ambos tipos de células fueron transfectadas con materiales compuestos que comprenden fibras de sepiolita sonicadas.

La Figura 4 muestra la afinidad entre las fibras de sepiolita y los ácidos nucleicos en ausencia (curva 4A) o la presencia de diferentes cationes polivalentes, Mg^{2+} (curva 4B), Ca^{2+} (curva 4C), espermidina (curva 4D) y espermina (curva 4E).

Descripción detallada del invento

- 35 La presente invención se basa en el uso de materiales compuestos particulares que comprenden fibras de sepiolita, que tienen una longitud media inferior o igual a 2 μm .

- 40 La sepiolita es un silicato de magnesio hidratado natural de fórmula celular de unidad teórica $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH},\text{F})_4(\text{H}_2\text{O})_{4,8}\text{H}_2\text{O}$. La sepiolita muestra una alternancia de bloques y túneles que crecen en la dirección de la fibra. Los bloques están constituidos por dos capas de sílice tetraédrica que intercalan una capa central de óxido de hidróxido de magnesio. La discontinuidad de las láminas de sílice da lugar a la presencia de grupos silanol (Si-OH) en los bordes de los canales, que son los túneles abiertos a la superficie externa de las partículas de sepiolita.

Según una realización preferida, el área superficial específica total de las fibras de sepiolita, determinada por mediciones BET, varía de 100 a 500 m^2/g , preferiblemente de 200 a 400 m^2/g .

En una realización preferida, la longitud media de las fibras de sepiolita es menor o igual a 1 μm , y mejor aún menor o igual a 800 nm. Más preferiblemente, la longitud media de las fibras de sepiolita varía de 150 a 850 nm.

- 45 La sepiolita usada en el material compuesto de la invención contiene ventajosamente menos del 1% en peso de fibras que tienen una longitud de al menos 5 μm , preferiblemente menos del 5% en peso de fibras que tienen una longitud de al menos 2,5 μm .

- 50 La distribución del tamaño (longitud y diámetro) de las fibras puede determinarse mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 912AB (modo de campo oscuro con iluminación inclinada).

Además, el diámetro medio de las fibras de sepiolita de la presente invención es preferiblemente menor o igual a 50 nm, más preferiblemente menor o igual a 25 nm, y mejor todavía si varía de 8 a 18 nm.

Ejemplos de fibras de sepiolita que pueden usarse en la presente invención son los productos vendidos por la empresa Tolsa S.A., con el nombre Pangel S9, y por la empresa Kremer Pigmente GmbH & Co, con el número 58945.

- 5 Según una realización preferida particular, las fibras de sepiolitas se sonicar antes de la preparación del material compuesto, es decir antes de ponerlas en contacto con los ácidos nucleicos.

De hecho, el solicitante ha descubierto que sonicar las fibras de sepiolita aumenta la afinidad entre las fibras y los ácidos nucleicos, y mejora la eficacia general de la transfección.

- 10 La concentración de las fibras de sepiolita en la composición de transfección de la presente invención normalmente varía de 0,1 a 5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, preferiblemente de 0,5 a 4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, y mejor aún de 1 a 3 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

El material compuesto usado en la presente invención comprende uno o más ácidos nucleicos que están unidos a las fibras de sepiolita.

- 15 Cuando dos o más cadenas de ácido nucleico distintas están presentes en la composición de transfección, el método de la invención es un método de cotransfección. El término distinto significa que las cadenas de ácido nucleico tienen estructuras diferentes.

En la presente invención, los ácidos nucleicos pueden elegirse en particular de ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y ácidos nucleicos modificados químicamente. Más preferiblemente, los ácidos nucleicos se eligen entre cadenas de ADN y cadenas de ARN.

- 20 Según una realización preferida, los ácidos nucleicos se eligen entre cadenas de ácido nucleico lineales o circulares, monocatenarias o bicatenarias. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en cualquier tipo de vector. Preferiblemente, el vector es un plásmido, tal como pCMV.

Según otra realización preferida, los ácidos nucleicos se eligen entre cadenas de ARN monocatenarias o bicatenarias. Preferiblemente, el ARN bicatenario es un ARNip.

- 25 La concentración de los ácidos nucleicos en la composición de transfección de la presente invención normalmente puede variar de 0,05 a 0,9 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, preferiblemente de 0,08 a 0,75 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

El material compuesto de la presente invención puede prepararse añadiendo los ácidos nucleicos descritos anteriormente a una suspensión de las fibras de sepiolita en un medio líquido. Los ácidos nucleicos se unen espontáneamente a las fibras de sepiolita.

El medio líquido se elige preferiblemente de agua, un medio de crecimiento o un tampón Tris-HCl.

- 30 Según una realización preferida, el medio líquido es un tampón Tris-HCl 10 mM, con un valor de pH igual a 7,5.

Según una realización preferida, la suspensión de fibras de sepiolita se sonica antes de la adición de los ácidos nucleicos.

La composición de transfección de la presente invención contiene ventajosamente dicho material compuesto en un medio líquido como se describe anteriormente.

- 35 La composición de transfección normalmente se prepara añadiendo dichos ácidos nucleicos directamente a las fibras de sepiolita en suspensión en dicho medio líquido.

- 40 En el material compuesto de la presente invención, la relación en peso entre la cantidad de dichos ácidos nucleicos y la cantidad de dichas fibras de sepiolita varía ventajosamente de 20 a 300 μg de ácidos nucleicos unidos por mg de fibras de sepiolita, preferiblemente de 50 a 270 μg de ácidos nucleicos unidos por mg de fibras de sepiolita, y mejor aún de 70 a 200 μg de ácidos nucleicos unidos por mg de fibras de sepiolita.

Según una realización particular de la invención, el material compuesto comprende además una o más moléculas adicionales que también están unidas a las fibras de sepiolita, elegidas entre moléculas biológicas, moléculas químicas y mezclas de las mismas.

- 45 En particular, las moléculas biológicas se eligen entre polisacáridos, virus, lípidos, proteínas y mezclas de los mismos, y más preferiblemente de proteínas.

Las moléculas químicas se eligen ventajosamente entre las toxinas que tienen un interés terapéutico, tal como la cloroquina.

Esta realización se puede lograr añadiendo dichas moléculas biológicas o químicas directamente en la composición de transfección descrita anteriormente.

La composición de transfección, según la presente invención, contiene además uno o más cationes polivalentes.

De hecho, el solicitante ha descubierto que, en presencia de cationes polivalentes, aumenta la afinidad entre las fibras de sepiolita y los ácidos nucleicos, lo que conduce a una mejora significativa de la eficacia global de la transfección.

En una realización preferida, los cationes polivalentes se eligen entre:

- 5 - cationes inorgánicos divalentes, tal como el Mg^{2+} y Ca^{2+} y
- aminas alifáticas policatiónicas, preferiblemente aminas trivalentes y tetravalentes, tales como espermidina y espermina.

Según una realización particularmente preferida, los cationes polivalentes son cationes inorgánicos divalentes, y se eligen aún más preferiblemente de Mg^{2+} , Ca^{2+} y mezclas de los mismos.

- 10 Los cationes polivalentes, presentes en la composición de transfección de la presente invención, tienen una concentración que preferiblemente varía de 0,5 a 100 mM, y más preferiblemente de 0,5 a 80 mM.

El método de la presente invención es un método para *in vitro*, transfectar células eucariotas *ex vivo* o *en vivo*. Según una realización preferida, las células eucariotas son células de mamífero. Como ejemplos preferidos de células de mamífero, se pueden mencionar células humanas, de mono, caninas, felinas, bovinas y murinas. Más

- 15 preferentemente, las células de mamífero son células humanas.

Las células eucariotas son ventajosamente células cancerosas de mamífero, y más preferiblemente células cancerosas humanas.

Según otra realización particular, las células eucariotas son células de insecto.

- 20 Las células eucariotas de la presente invención pueden provenir de líneas celulares establecidas o de cultivos celulares primarios. Preferiblemente, las células eucariotas provienen de líneas celulares establecidas. Los ejemplos de líneas celulares establecidas son las células de hámster chino (células V79) y las células de osteosarcoma humano (células U2OS).

Además, las células eucariotas de la presente invención pueden ser células en división o células en no división, preferiblemente células en división.

- 25 Las células eucariotas de la invención pueden ser células somáticas o madre, preferiblemente células somáticas.

Las células eucariotas se cultivan en un medio de crecimiento apropiado, que puede complementarse con varios factores de crecimiento, nutrientes y antibióticos. Los ejemplos de medios de crecimiento adecuados incluyen medio Eagle modificado (MEM) y medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), dependiendo de la línea celular.

- 30 Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán la elección del medio de crecimiento, porque algunas células requieren un medio de crecimiento especial. Por lo tanto, un experto en la materia adaptará la preparación del medio de crecimiento a las células estudiadas, incluyendo pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento, nutrientes y antibióticos.

Preferiblemente, el medio de crecimiento usado en la presente invención comprende un 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS), en relación con el volumen total del medio de crecimiento.

- 35 Además, las condiciones de cultivo, tales como la temperatura y el porcentaje de CO_2 , será adaptado por una persona experta en la técnica, dependiendo de los tipos de células. Según una realización preferida, las células eucariotas se incuban a 37 °C y con 5% de CO_2 .

La densidad óptima de las células depende de los tipos de células y del propósito particular del método de transfección.

- 40 El medio de crecimiento puede contener además uno o más componentes adicionales. Preferiblemente, el medio de crecimiento comprende cloroquina.

Antes de poner en contacto las células con la composición de transfección, el medio de crecimiento se elimina preferiblemente y se reemplaza por un medio de crecimiento nuevo. Preferiblemente, el medio de crecimiento nuevo comprende cloroquina.

- 45 Según una realización preferida de la invención, las células eucariotas se incuban con cloroquina antes de ponerlas en contacto con la composición de transfección.

De hecho, el solicitante ha descubierto que la transferencia de ácidos nucleicos aumenta cuando las células han sido tratadas previamente con cloroquina. Por lo tanto, se mejora la eficacia general de la transfección.

Las células eucariotas se preincubaban con cloroquina, poniéndolas en contacto con cloroquina, durante un período que varía ventajosamente de 5 a 60 minutos, y más preferiblemente de 15 a 45 minutos antes de la introducción de la composición de transfección.

5 La cloroquina puede estar presente en una concentración que varía de 2 a 100 μM , y preferiblemente de 5 a 25 μM con respecto al medio de crecimiento celular.

El método para transfectar células eucariotas *in vitro* o *ex vivo* según la presente invención comprende una etapa en la que las células eucariotas se ponen en contacto con la composición de transfección descrita anteriormente.

Esto puede lograrse ventajosamente introduciendo la composición de transfección directamente en el medio de crecimiento que contiene dichas células.

10 Según otra realización preferida, la composición de transfección se pone en contacto directo con las células, antes de añadir el medio de crecimiento.

15 El método de transfección, según la presente invención, no requiere acción mecánica, como una fricción mecánica, de las fibras de sepiolita en las membranas celulares eucariotas para permitir la internalización celular de los materiales compuestos. El material compuesto solo se pone en contacto con las células eucariotas, sin ninguna acción mecánica sobre las células y/o el material compuesto.

La concentración de las fibras de sepiolita en el medio que rodea dichas células eucariotas, después de contactar dichas células eucariotas con la composición de transfección, varía preferiblemente de 0,1 a 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, más preferiblemente de 1 a 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, y mejor aún de 5 a 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

20 El medio que rodea las células eucariotas durante la transfección en sí normalmente está compuesto de una mezcla del medio de crecimiento y la composición de transfección.

Según una realización preferida, las células eucariotas se ponen en contacto con la composición de transfección durante un período que es superior o igual a una hora.

Más preferiblemente, las células eucariotas se ponen en contacto con la composición de transfección durante un período que varía de 1 a 60 horas, y mejor aún de 6 a 48 horas.

25 Después de que la transfección se haya completado lo suficiente, el proceso puede detenerse simplemente reemplazando el medio líquido que rodea las células, que normalmente está hecho de una mezcla del medio de crecimiento y de la composición de transfección, con un medio de crecimiento nuevo que no contiene el dicho material compuesto.

30 La eficacia del método de transfección puede analizarse mediante diferentes métodos. El nivel de expresión del gen objetivo puede ser detectado por genes informadores, como por ejemplo el gen mKate2, el gen de la luciferasa o la expresión del gen de la β -galactosidasa. La señal de mKate2 se puede observar directamente bajo un microscopio de fluorescencia, la actividad de la luciferasa puede detectarse con un luminómetro y el producto azul catalizado por la β -galactosidasa se puede observar con un microscopio o un lector de microplacas. Una persona experta en la técnica está familiarizada con el funcionamiento de estos reporteros y cómo pueden ser introducidos en un sistema de
35 administración de genes.

40 El ácido nucleico y sus productos de expresión pueden determinarse mediante diversos métodos, tales como la detección de inmunofluorescencia o inmunocitoquímica enzimática, autorradiografía o hibridación in situ. Si se usa la inmunofluorescencia para detectar la expresión de una proteína codificada, se usa un anticuerpo marcando una señal fluorescente que se une a la proteína objetivo. Las células que contienen la proteína se identifican detectando una señal fluorescente. Si las moléculas administradas pueden modular la expresión génica, el nivel de expresión génica objetivo también puede determinarse mediante métodos tales como autorradiografía, hibridación in situ y PCR in situ.

45 Otro método útil para evaluar la eficacia de la transfección, que se usó en los ejemplos a continuación, consiste en transfectar las células con un plásmido que codifica un gen resistente a un antibiótico particular, como G418. Las células transfectadas se vuelven resistentes al antibiótico y, por lo tanto, se pueden seleccionar fácilmente simplemente añadiendo el antibiótico al medio que contiene las células. El número de células transfectadas se puede estimar visualmente.

El método de identificación puede elegirse dependiendo de las propiedades de los ácidos nucleicos administrados y/o sus productos de expresión.

50 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, uno o más materiales compuestos como se describe anteriormente, y uno o más cationes polivalentes, preferiblemente elegidos entre:

- cationes inorgánicas divalentes, como el Mg^{2+} y Ca^{2+} y
- aminas alifáticas policatiónicas, preferiblemente aminas trivalentes y tetravalentes, tales como espermina y espermidina.

5 Dicho material compuesto comprende fibras de sepiolita, que tienen una longitud media inferior o igual a $2\ \mu m$, unidas con uno o más ácidos nucleicos.

Preferiblemente, la composición farmacéutica se usa para transfectar células de mamífero.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la presente invención es para uso en terapia génica.

10 Más preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención es para uso en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardiovasculares, SIDA, trastornos genéticos o trastornos autoinmunes, y aún mejor en el tratamiento del cáncer.

El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor, incluido un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, un melanoma, un tumor pediátrico y un tumor de leucemia.

15 En particular, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, incluido un sarcoma gastrointestinal, un cáncer renal, un cáncer de mama, una leucemia, un linfoma de Hodgkin, un neuroblastoma, un cáncer de próstata, un cáncer de esófago, un cáncer de colon, un cáncer rectal, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer testicular, un cáncer de vejiga, un cáncer de pulmón, un cáncer de tiroides, un osteosarcoma y un melanoma.

Según otra realización preferida, la composición farmacéutica de la presente invención es para usar en la inmunización de mamíferos, y más preferiblemente en la inmunización de humanos.

20 Otro objeto de la presente invención es un material compuesto como se describió anteriormente, para su uso para transfectar células de mamífero. Dicho material compuesto comprende fibras de sepiolita, que tienen una longitud media inferior o igual a $2\ \mu m$, unidas con uno o más ácidos nucleicos.

Otras características y ventajas de la invención se dan en la siguiente sección experimental, que debe considerarse como ilustrativa y no limitativa del alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

25 Suspensiones de sepiolita

Se prepararon dos suspensiones de sepiolita dispersando fibras de sepiolita (Pangel S9 de Tolsa, que tiene una longitud media que varía de 200 a 600 nm y un diámetro medio de 15 nm) en un tampón Tris-HCl (10 mM, pH = 7,5) para obtener una concentración final de fibras de sepiolita de $2\ \mu g.\mu l^{-1}$. La primera suspensión de sepiolita (Sep) se mezcló vigorosamente durante al menos 10 minutos, mientras que la segunda suspensión de sepiolita (sSep) se sonicó tres veces al 30% de amplitud durante 10 segundos cada vez con un Vibra cell 75042 (Bioblock Scientific).

Cultivos celulares

Se cultivaron células de hámster chino (células V79) en placas como monocapas en medio de Eagle modificado (MEM) suplementado con 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS), en relación con el volumen total del medio.

35 Se cultivaron células de osteosarcoma humano (células U2OS) en placas como monocapas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% en volumen de FBS, en relación con el volumen total del medio.

Las células V79 y U2OS se incubaron a $37\ ^\circ C$, con 5% de CO_2 en aire y 100% de humidificación.

MEM, DMEM y FBS se adquirieron de Life Technologies™.

Las células V79 y U2OS se dividieron en 6 pocillos/placas a una densidad de $2 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^4$ respectivamente.

40 Ejemplo 1

(a) Para transfectar células V79, se prepararon 70 μl de una composición de transfección mezclando:

- 40 μl de suspensión de sepiolita (Sep o sSep) como se describió anteriormente,
- 14 μl de $CaCl_2$ 50 mM,
- 7,8 μl de TrisHCl 10 mM y
- 45 - 8,2 μl de pCMV (0,49 $\mu g.\mu l^{-1}$) que codifica el gen resistente a G418.

Para comparar la eficacia de la transfección en presencia de fibras de sepiolita sonicadas y no sonicadas en células V79, se prepararon dos composiciones de transfección: una usando la suspensión no sonicada de fibras de sepiolita (Sep) y la otra usando la suspensión sonicada de fibras de sepiolita (sSep).

Después de 2 horas de agitación, se añadieron 5,83 ml de MEM, suplementado con FBS como se describió anteriormente, y se obtuvieron así dos composiciones de transfección.

(b) Para transfectar células U2OS, se prepararon 70 µl de una composición de transfección mezclando:

- 40 µl de suspensión de sepiolita (Sep o sSep) como se describió anteriormente,
- 14 µl de CaCl₂ 50 mM, y
- 16 µl de pCMV (0,49 µg.µl⁻¹) que codifica el gen resistente a G418.

Para comparar la eficacia de transfección en presencia de fibras de sepiolita sonicadas y no sonicadas en células U2OS, se prepararon dos composiciones de transfección: una que usa la suspensión no sonicada de fibras de sepiolita (Sep) y la otra que usa la suspensión sonicada de fibras de sepiolita (sSep).

Después de 2 horas de agitación, se añadieron 8,9 ml de DMEM, suplementado con FBS como se describió anteriormente, y así se obtuvo una composición de transfección.

El medio de crecimiento de las células V79 y U2OS se eliminó y se reemplazó por 3 ml de cada una de las composiciones de transfección (a) y (b) como se describió anteriormente.

Después de dos días, las células se lavaron con PBS y medio de crecimiento nuevo, suplementado con antibiótico G418 (600 ng.µl⁻¹ para células V79 y 0,8µg.µl⁻¹ para células U2OS), se añadió, para comenzar la selección.

10 días después, las colonias de células se tiñeron con Giemsa (25% en etanol) y se estimó el número de colonias.

Cuanto más colonias haya, mejor será la transfección. Los resultados obtenidos para las células V79 se muestran en la Figura 1.

La Figura 1 muestra que se logra una transfección satisfactoria en ambos casos para las células V79. La transfección aumenta aún más cuando se sonicaron las fibras de sepiolita, utilizadas en el material compuesto. De hecho, las células transfectadas usando fibras de sepiolita sonicadas (Figuras 1B) muestran una mayor resistencia a los antibióticos con respecto a las células transfectadas usando fibras de sepiolita no sonicadas (Figuras 1A). Los mismos resultados (no mostrados) también se observan con células humanas U2OS.

Ejemplo 2

Se prepararon 70 µl de una composición de transfección mezclando:

- 40 µl de suspensión de sepiolita no sonicada (Sep) como se describe anteriormente,
- 14 µl de CaCl₂ 50 mM,
- 7,8 µl de TrisHCl 10 mM y
- 8,2 µl de pCMV (0,49 µg.µl⁻¹) que codifica el gen resistente a G418.

Para comparar la eficacia de transfección en presencia de diferentes cationes polivalentes, se prepararon cuatro composiciones de transfección, usando la mezcla como se describió anteriormente en la que CaCl₂ fue reemplazado con MgCl₂ (50 mM), espermina (1 mM) y espermidina (1 mM).

Las mezclas se agitaron después a 25 °C y 700 rpm en un termomezclador (Eppendorf).

Después de 2 horas, se añadieron 5,83 ml de MEM, suplementado con FBS como se describió anteriormente, y se obtuvieron así cuatro composiciones de transfección.

El medio de crecimiento de las células V79 se retiró y se reemplazó por 3 ml de cada composición de transfección.

Después de dos días, las células se lavaron con PBS y medio de crecimiento nuevo, suplementado con antibiótico G418 (0,6 µg.µl⁻¹), se añadió para iniciar la selección.

10 días después, las colonias de células se tiñeron con Giemsa (25% en etanol) y se estimó el número de colonias.

Cuanto más colonias haya, mejor será la transfección. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.

La figura 2 muestra que la presencia de cationes divalentes mejora la eficiencia de la transfección. Además, las células transfectadas en presencia de Mg²⁺ (Figura 2A, izquierda) o Ca²⁺ (Figura 2A, derecha y Figura 2B, 1-2) presentan más

resistencia a los antibióticos que las células transfectadas en presencia de espermidina (Figura 2B, 3-4) o espermina (Figura 2B, 5-6).

Ejemplo 3

Se prepararon 70 µl de una composición de transfección mezclando:

- 5 - 40 µl de suspensión de sepiolita sonicada (sSep) como se describe anteriormente,
- 14 µl de CaCl₂ 50 mM, y
- 16 µl de pCMV (0,49 µg.µl⁻¹) que codifica el gen resistente a G418.

Después de 2 horas de agitación, se añadieron 8,9 ml de DMEM, suplementado con FBS como se describió anteriormente, y así se obtuvo una composición de transfección.

- 10 La transfección se realizó en células U2OS como se describió anteriormente.

La transfección también se realizó en células U2OS que se pretrataron con cloroquina, incubándolas 30 minutos en medio de crecimiento nuevo suplementado con cloroquina (10 µM) antes de la transfección.

En cada caso, el medio de crecimiento celular se retiró y se reemplazó por 3 ml de la composición de transfección para comenzar la transfección.

- 15 Después de dos días, las células se lavaron con PBS y medio de crecimiento nuevo, suplementado con se añadió antibiótico G418 (0,8 µg.µl⁻¹), para iniciar la selección.

10 días después, las colonias de células se tiñeron con Giemsa (25% en etanol) y se estimó el número de colonias.

Cuanto más colonias haya, mejor será la transfección. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

- 20 La Figura 3 muestra que la eficacia de transfección aumenta cuando las células se pretratan con cloroquina. De hecho, las células tratadas con cloroquina y después transfectadas con fibras de sepiolitas sonicadas (Figura 3B) fueron más resistentes a los antibióticos que las células solo transfectadas con fibras de sepiolitas sonicadas (Figura 3A).

Ejemplo 4

Para medir la afinidad entre las fibras de sepiolita y los ácidos nucleicos, se prepararon 50 µl de una composición de sepiolita/ADN mezclando:

- 25 - 25 µl de suspensión de sepiolita no sonicada (Sep) como se describe anteriormente,
- 5 µl de TrisHCl 10 mM y
- 20 µl de solución de ADN de esperma de salmón.

El ADN de esperma de salmón se adquirió de Sigma-Aldrich (31149-50G-F) y se disolvió en TrisHCl 10 mM (pH = 7,5) para proporcionar una solución de ADN de esperma de salmón.

- 30 Se prepararon varias composiciones de sepiolita/ADN usando la mezcla como se describió anteriormente en la que la concentración de ADN de esperma de salmón varió de 70 a 800 ng.µl⁻¹.

Con el fin de comparar la afinidad entre las fibras de sepiolita y los ácidos nucleicos en presencia de diferentes cationes polivalentes, se prepararon cinco composiciones de sepiolita/ADN, que tienen la misma concentración inicial de ADN de esperma de salmón, utilizando la mezcla como se describió anteriormente en la que se utilizó TrisHCl reemplazado con CaCl₂ (50 mM), MgCl₂ (50 mM), espermina (10 mM) y espermidina (10 mM).

- 35 Las mezclas se agitaron después a 25 °C y 700 rpm en un termomezclador (Eppendorf).

Después de 24 horas, las mezclas se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm, y la concentración de ADN en el sobrenadante se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. En otras palabras, los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante correspondían a los ácidos nucleicos que no se adsorbían en las fibras de sepiolita.

- 40 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

La Figura 4 muestra que la afinidad entre los ácidos nucleicos y las fibras de sepiolita mejora cuando la composición de sepiolita/ADN comprende cationes polivalentes. De hecho, a una concentración inicial de 800ng.µl⁻¹, solo el 12% del ADN se adsorbe en ausencia de cationes polivalentes (Figura 4, curva A), mientras que el 20% de los ácidos nucleicos se adsorben en las fibras de sepiolita en presencia de Mg²⁺ (Figura 4, curva B) y Ca²⁺ (Figura 4, curva C).

La Figura 4 muestra que la afinidad entre los ácidos nucleicos y las fibras de sepiolita mejora cuando la composición de sepiolita/ADN comprende cationes polivalentes. De hecho, a una concentración inicial de 800ng.µl⁻¹, solo el 12% del ADN se adsorbe en ausencia de cationes polivalentes (Figura 4, curva A), mientras que el 20% de los ácidos nucleicos se adsorben en las fibras de sepiolita en presencia de Mg²⁺ (Figura 4, curva B) y Ca²⁺ (Figura 4, curva C).

Además, el porcentaje de ADN adsorbido alcanza casi el 30% en presencia de espermidina (Figura 4, curva D) y espermina (Figura 4, curva E).

REIVINDICACIONES

1. Un método para transfectar células eucariotas *in vitro* o *ex vivo* con uno o más ácidos nucleicos en donde dichas células se ponen en contacto con una composición de transfección que contiene uno o más materiales compuestos que comprenden fibras de sepiolita, que tienen una longitud media menor o igual a 2 μm , unida a dichos ácidos nucleicos, y uno o más cationes polivalentes.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la longitud media de las fibras de sepiolita es menor o igual a 1 μm , preferiblemente menor o igual a 800 nm, y más preferiblemente varía de 150 a 850 nm.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el diámetro medio de las fibras de sepiolita es menor o igual a 50 nm, preferiblemente menor o igual a 25 nm, y más preferiblemente varía de 8 a 18 nm.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las fibras de sepiolita se sonicán antes de la preparación del material compuesto.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los ácidos nucleicos se eligen de ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y ácidos nucleicos modificados químicamente, y preferiblemente de cadenas de ácidos nucleicos lineales o circulares, monocatenarias o bicatenarias.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación en peso entre la cantidad de dichos ácidos nucleicos y la cantidad de dichas fibras de sepiolita en dicho material compuesto varía de 20 a 300 μg de ácidos nucleicos unidos por mg de fibras de sepiolita, preferiblemente de 50 a 270 μg de ácidos nucleicos unidos por mg de fibras de sepiolita, y aún mejor de 70 a 200 μg de ácidos nucleicos unidos por mg de fibras de sepiolita.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cationes polivalentes se eligen entre:
 - cationes inorgánicos divalentes, como el Ca^{2+} y Mg^{2+} , y
 - aminas alifáticas policatiónicas, preferiblemente aminas trivalentes y tetravalentes, tales como espermidina y espermina.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células eucariotas se derivan de líneas celulares establecidas o de cultivo celular primario.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células eucariotas son células en división o células no en división.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células eucariotas se tratan con cloroquina antes de ponerlas en contacto con la composición de transfección.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de las fibras de sepiolita en el medio que rodea dichas células eucariotas, después de poner en contacto dichas células con la composición de transfección, varía de 0,1 a 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, preferiblemente de 1 a 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, y mejor aún de 5 a 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.
12. Composición farmacéutica que contiene, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, uno o más materiales compuestos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y uno o más cationes polivalentes, preferiblemente como se define en la reivindicación 7.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 para su uso para transfectar células de mamífero.
14. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 12 o 13 para su uso en terapia génica, y preferiblemente para su uso en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardiovasculares, SIDA, trastornos genéticos o trastornos autoinmunes, y preferiblemente en el tratamiento del cáncer.
15. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 12 o 13 para su uso en la inmunización de mamíferos, y preferiblemente en la inmunización de humanos.

FIG. 1

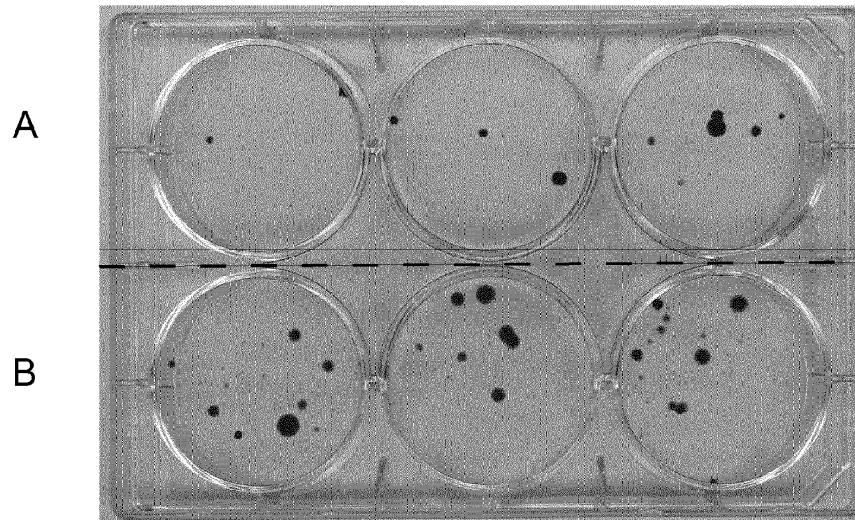


FIG. 2

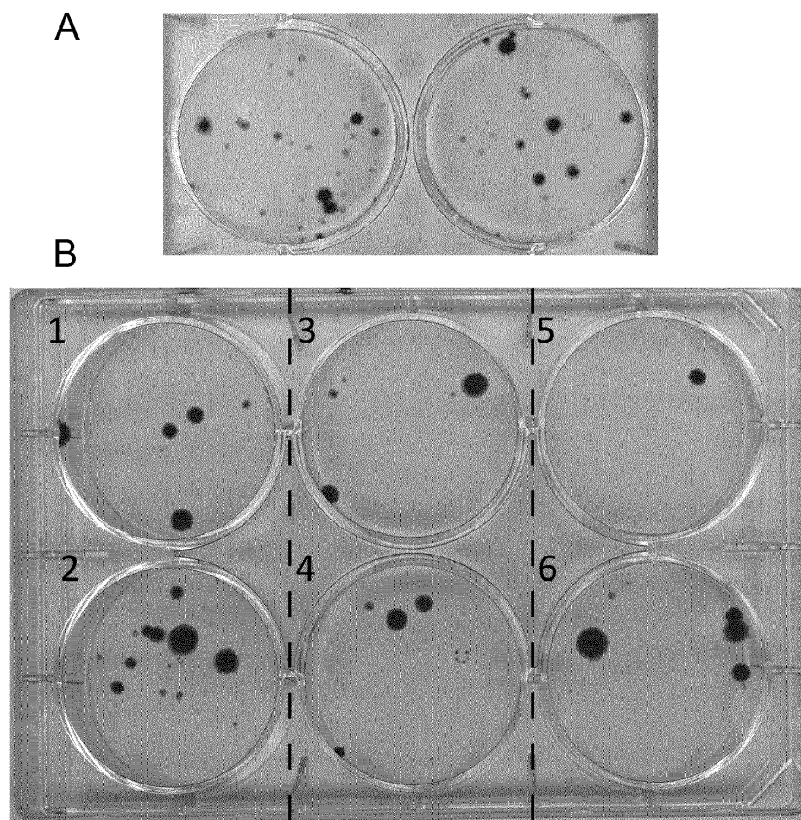


FIG. 3

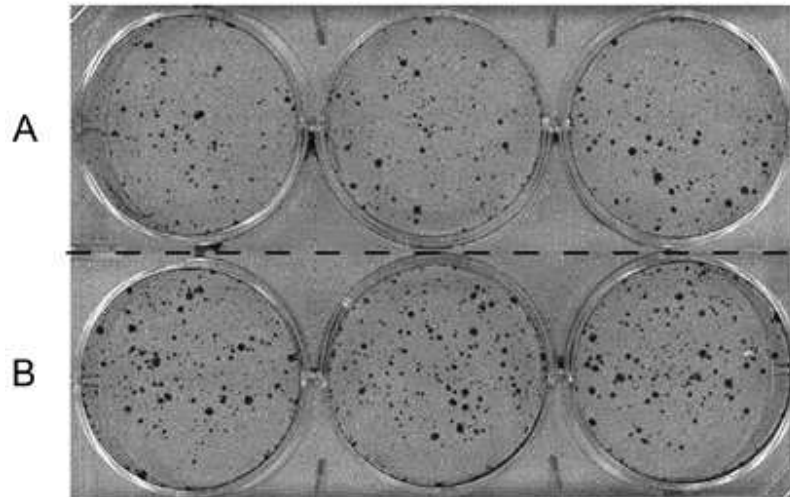


FIG. 4

