

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 762**

21 Número de solicitud: 201830507

51 Int. Cl.:

A61K 47/59 (2007.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C08G 73/02 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.05.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.11.2019

71 Solicitantes:

**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED, M.P. (42.0%)
C/ Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11
28029 MADRID ES;
SAGETIS BIOTECH, S.L. (23.0%);
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (20.0%) y
INTITUT QUÍMIC DE SARRIÀ CETS FUNDACIÓ
PRIVADA (15.0%)**

72 Inventor/es:

**MECA CORTÉS, Oscar;
MARTINEZ MARTINEZ, Gema;
CASCANTE CIRERA, Anna;
BLANCO FERNANDEZ, Jerónimo;
RUBIO VIDAL, Nuria;
BALCELLS GARCIA, Laura y
BORRÓS GOMEZ, Salvador**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Nanopartículas multicomponente y uso de las mismas**

ES 2 732 762 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 762**

21 Número de solicitud: 201830507

57 Resumen:

Nanopartículas multicomponente y uso de las mismas.

La invención se refiere a nanopartículas multicomponente para la transfección y selección de células. Las nanopartículas comprenden (a) nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION), (b) un polímero que es un poli (beta-amino éster) (pBAE) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido y que tiene una masa molecular de entre 1.000 y 10.000 Da y (c) un polinucleótido. Estas partículas multicomponente potencian la eficiencia de transfección de la administración génica no viral en diferentes tipos de células. Además, la característica magnética de estas innovadoras nanopartículas permite la rápida y masiva separación de células que contienen partículas mediante la aplicación de un campo magnético fuerte.

ES 2 732 762 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas multicomponente y uso de las mismas

La invención se refiere a nanopartículas multicomponente y sus usos. En particular, la
5 invención se refiere a nanopartículas de administración génica no viral para la transfección y selección de células.

ESTADO DE LA TÉCNICA

En el desarrollo de partículas para mejorar el sistema de administración génica no viral
10 para la modificación genética de células eucariotas, deben tenerse en cuenta tres requisitos principales:

- las partículas deben ser biocompatibles (no producir daño en sistemas *in vitro/in vivo*),
- las partículas deberían aumentar la transfección celular,
- 15 - las partículas deben permitir la rápida y significativa separación de células bajo un campo magnético.

Con este objetivo, se han utilizado diferentes partículas o composiciones en el estado
de la técnica para albergar moléculas terapéuticas, además de sondas relacionadas
20 con la obtención de imágenes moleculares eficiente y simultáneamente.

Por ejemplo, el documento WO2013/049531A2 divulga composiciones para la transfección de células que comprenden una micela que tiene un núcleo de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) hidrófobas, un primer
25 recubrimiento que comprende un polímero catiónico tal como quitosano y polietilenimina, y un segundo recubrimiento que comprende un polinucleótido.

El documento WO2014/136100A1 se refiere a polímeros que son poli(beta-amino ésteres) (pBAE) modificados con al menos un oligopéptido. Los polímeros pueden usarse en cualquier campo donde se ha encontrado que los polímeros son útiles, que
30 incluyen en campos médicos, particularmente en la liberación de fármacos.

El siguiente artículo científico: *Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction*, Benedikt Steitz, et al. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311
35 (2007) 300–305, divulga nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) recubiertas con polietilenimina que se usan para la transfección de células.

La presente invención proporciona nuevas partículas multicomponente que potencian la eficiencia de transfección de la administración génica no viral en diferentes tipos de células. Además, la característica magnética de estas innovadoras nanopartículas permite la rápida y considerable separación de células que contienen partículas por aplicación de un campo magnético fuerte.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han encontrado que la combinación de estos tres componentes específicos en una nanopartícula: nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION), ciertos poli(beta-amino ésteres) (pBAE) y un polinucleótido, potencia la eficiencia de transfección de células, promueve la endocitosis de partículas para la administración del polinucleótido diana y facilitan la rápida y considerable separación de células que contienen partículas por la aplicación de un campo magnético fuerte. Una ventaja adicional de la nanopartícula es que también puede usarse como contraste de resonancia magnética para la imagen por resonancia magnética y seguimiento de células marcadas, cuando dichas células se usan para investigación clínica o de animales vivos.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una nanopartícula multicomponente que tiene dimensiones de partícula entre 1 y 1.000 nanómetros y comprende:

- a) nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) que tienen dimensiones de partícula entre 20 y 100 nanómetros,
 - b) un polímero que es un poli (beta-amino éster) (pBAE) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido, dicho polímero tiene una masa molecular entre 1.000 y 10.000 Da y
 - c) un polinucleótido,
- en la que la relación de peso entre el polímero y el polinucleótido es entre 25:1 y 200:1 y la relación de peso entre el polímero y SPION es entre 200:1 y 700:1.

La masa molecular de los polímeros se determinó en un sistema Hewlett-Packard 1050 Series HPLC equipado con dos columnas GPC Ultrastyrigel, 103 y 104 Å (5 µm mezclados, 300 mm X 19 mm, Waters Millipore Corporation, Milford, MA, EE.UU) y THF como fase móvil. La masa molecular se calculó comparando con los tiempos de retención de patrones de poliestireno (Segovia, N., Dosta, P., Cascante, A., Ramos, V., Borrós, S., Oligopeptide-terminated poly(β-amino ester)s for highly efficient gene

delivery and intracellular localization, *Acta Biomaterialia* (2014), 10(5):2147-58).

En una realización preferida de la invención, la nanopartícula multicomponente tiene dimensiones de partícula entre 50 y 500 nm, más preferentemente 100 y 400 nm, incluso más preferentemente entre 140 y 250 nm.

En una realización preferida de la invención, el poli(beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido tiene una masa molecular entre 2.000 y 3.000 Da.

En una realización preferida de la invención, la relación de peso entre el polímero y el polinucleótido es entre 50:1 y 100:1.

En una realización preferida de la invención, la relación de peso entre el polímero y SPION es 300:1.

Las nanopartículas multicomponente de la invención que comprenden los componentes anteriormente mencionados pueden tener dos estructuras diferentes:

- Una estructura, llamada "tipo M", que comprende un núcleo de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION), una primera capa de polímero que encapsula el núcleo, una capa de polinucleótido y una segunda capa de polímero, en la que la capa de polinucleótido está entre las capas de polímero. Las nanopartículas multicomponente de tipo M consisten en 4 capas: un núcleo formado por SPION; una capa de polímero que encapsula el núcleo; una capa de polinucleótido y otra capa de polímero para garantizar la encapsulación del ADN.

- Una estructura, llamada "tipo S", en la que el polinucleótido está encapsulado por una capa que comprende el polímero y las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION).

En ambas estructuras ("tipo M" y "tipo S"), el polímero interacciona electrostáticamente con el polinucleótido y con nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION).

Los pBAE de las nanopartículas de la presente invención muestran masa molecular más baja, interaccionan electrostáticamente con el material genético y no se unen covalentemente a SPION.

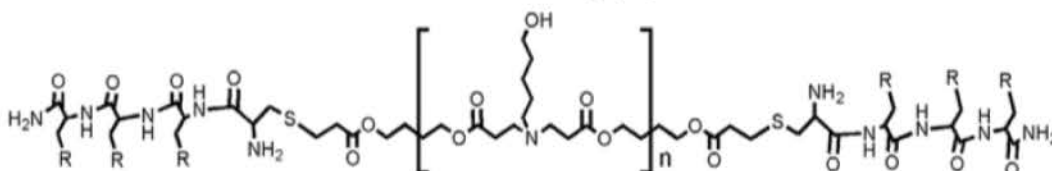
En una realización preferida de la presente invención, el poli(beta-amino éster) está modificado con al menos un oligopéptido, en el que el oligopéptido comprende preferentemente al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico.

5

En otra realización preferida de la presente invención, el poli(beta-amino éster) está modificado con al menos un oligopéptido que comprende tres aminoácidos iguales, más preferentemente el aminoácido está seleccionado del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico.

10

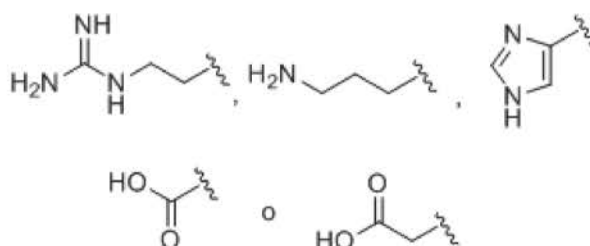
En una realización preferida de la presente invención, el poli (beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido tiene la fórmula:



en la que n oscila de 4 a 14, preferentemente de 5 a 8.

15

y R es un grupo seleccionado de:



En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido está seleccionado del grupo que consiste en ADN y ARN. Más preferentemente, el polinucleótido es un plásmido de ADN. El polinucleótido también puede ser ARNm, ARNip y miARN.

20

El método de preparación de una nanopartícula multicomponente "tipo S" de la invención incluye las siguientes etapas:

25

a) preparación del poli(beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido,

b) poner en contacto el poli (beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido obtenido en la etapa a) con una solución del polinucleótido e incubar la mezcla durante un tiempo entre 15 y 30 minutos, donde la relación en peso

entre el polímero y el polinucleótido en la solución que va a incubarse es entre 25:1 y 200:1,

c) se añade una solución acuosa de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) a la solución obtenida en la etapa (b) , donde la relación

5 de peso entre el polímero y SPION en la solución resultante es entre 200:1 y 700:1,

d) una etapa final opcional es la purificación de las nanopartículas obtenidas mediante liofilización.

Opcionalmente, si no se realiza la etapa d), la solución de nanopartículas se diluye en
10 DMEM sin suero (4,5 g de glucosa/ml sin glutamina, pH = 7,2) antes de cada transfección o en PBS (1X, pH = 7,4) antes de su análisis de DLS (dispersión de luz dinámica).

La solución en la etapa b) es preferentemente tampón acetato sódico, más
15 preferentemente es tampón acetato sódico 25 mM.

La incubación en la etapa b) se lleva a cabo en un intervalo de temperatura entre 20 y 40 °C, preferentemente a 37 °C.

20 El método de preparación de una nanopartícula multicomponente "tipo M" de la invención incluye las siguientes etapas:

a) preparación del poli(beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido,

b) poner en contacto una solución de nanopartículas de óxido de hierro
25 superparamagnético (SPION) con una primera porción del poli(beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido obtenido en la etapa a),

c) se añade una solución del polinucleótido a la solución obtenida en la etapa b) y la mezcla formada se incuba durante un tiempo entre 15 y 30 minutos,

d) se añade una segunda porción de la misma cantidad que la primera porción del poli
30 (beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido obtenido en la etapa a) a la mezcla obtenida en la etapa c),

e) una etapa final opcional es la purificación de las nanopartículas obtenidas mediante liofilización.

35 Opcionalmente, si no se realiza la etapa e), la solución de nanopartículas se diluye en DMEM sin suero (4,5 g de glucosa/ml sin glutamina, pH = 7,2) antes de cada transfección o en PBS (1X, pH = 7,4) antes de su análisis de DLS.

La incubación en la etapa c) se lleva a cabo en un intervalo de temperatura entre 20 y 40 °C, más preferentemente a 37 °C.

- 5 Cuando se aíslan y purifican nanopartículas (etapa e)), pueden disolverse en diferentes tampones acuosos, preferentemente PBS, tampón acetato sódico o DMEM.

10 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición que incluye las nanopartículas multicomponente descritas en el primer aspecto de la invención.

15 Preferentemente, la composición comprende las nanopartículas de la invención y un tampón seleccionado de PBS (solución salina tamponada con fosfato), tampón acetato sódico o DMEM (medio esencial mínimo de Eagle).

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende una nanopartícula multicomponente como se define en el primer aspecto de la presente invención. Preferentemente, la célula es eucariota.

20 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una nanopartícula multicomponente como se define en el como se define en el primer aspecto de la presente invención para su uso en medicina. Más preferentemente, en la transfección de células.

25 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas multicomponente de la presente invención para la transfección de células, preferentemente para la transfección de células en células eucariotas.

30 La combinación de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION), un polímero, que es un poli (beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido y que tiene una masa molecular de entre 1.000 y 10.000 Da, más preferentemente entre 2.000 y 3.000 Da, potencia la eficiencia de captación y transfección celular. En la presente invención, se ha demostrado la influencia positiva de estas nanopartículas magnéticas (SPION) sobre la eficiencia de transfección en
35 diferentes líneas celulares cuando se combinan de formas específicas con un sistema de administración génica bien establecido.

Además, la transfección de células usando las nanopartículas multicomponente de la presente invención permite detectar las células o tejidos por imagen por resonancia magnética. Células o tejidos de interés se ponen en contacto con una nanopartícula de la invención y se mide el nivel de unión de la nanopartícula.

5

Los polímeros (pBAE) de las nanopartículas multicomponente de la presente invención tienen grupos biodegradables capaces de mejorar la administración de polinucleótidos a células y han mostrado alta eficacia de transfección y reducida citotoxicidad *in vitro* en comparación con los polímeros usados en el estado de la técnica para el mismo fin y agentes de transfección comerciales.

10

Las nanopartículas multicomponente de la presente invención son biocompatibles y suficientemente resistentes a su entorno de uso tal que una cantidad suficiente de las nanopartículas sigue sustancialmente intacta después de la entrada en el cuerpo del mamífero de manera que son capaces de alcanzar la diana deseada y lograr el efecto fisiológico deseado.

15

En el presente documento, el término “nanopartícula” se refiere a una partícula con dimensiones, o diámetro esférico equivalente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm, preferentemente entre 50 y 500 nm, aunque las nanopartículas no necesitan ser de forma esférica. Como se usa en el presente documento, el término “diámetro eficaz” se refiere al diámetro de nanopartícula promedio de nanopartículas aproximadamente esféricas.

20

El diámetro medio de las nanopartículas de la presente invención puede ser determinado por métodos conocidos en la técnica, preferentemente por dispersión de luz dinámica. En particular, la invención se refiere a nanopartículas que son partículas sólidas con un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm cuando se analizan por dispersión de luz dinámica a un ángulo de dispersión de 90° y a una temperatura de 25 °C, usando una muestra apropiadamente diluida con agua filtrada y un instrumento adecuado tal como los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (RU) según el método de prueba estándar ISO 22412:2008 (método de cumulantes A.1.3.2). Donde una partícula se dice que tienen un diámetro de x nm, generalmente será una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50 % en número (por ejemplo >60 %, >70 %, >80 %, >90 %, o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo $x \pm 20$ %.

30

35

El término “dimensiones” se refiere especialmente a uno o más de longitud, anchura y diámetro, dependiente de la forma de las nanopartículas.

5 El término “transfección”, como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de material genético externo en la célula usando plásmidos, vectores virales (el término transducción también se usa en este caso) u otras herramientas de transferencia. Para métodos no virales, el término transfección se usa generalmente para referirse a células de mamífero eucariotas.

10 El término “polinucleótido”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos covalentemente unida (es decir, ribonucleótidos para ARN y desoxirribonucleótidos para ADN) en la que la posición 3' de la pentosa de un nucleótido está unida por un grupo fosfodiéster a la posición 5' de la pentosa del siguiente, incluyen secuencias de cualquier forma de ácido nucleico, que incluyen,
15 pero no se limitan a, ARN y ADN. El término “polinucleótido” incluye, sin limitación, polinucleótido mono y bicatenario.

Según la presente invención, un “oligopéptido” comprende una cadena de al menos tres aminoácidos unidos juntos por enlaces peptídicos. Tales péptidos contienen
20 preferentemente solo aminoácidos naturales, aunque alternativamente pueden emplearse aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza pero que pueden incorporarse en una cadena de polipéptidos) y/o análogos de aminoácidos como son conocidos en la técnica. Por tanto, uno o más de los aminoácidos en tales péptidos puede modificarse, por ejemplo, mediante la adición de
25 una entidad química tal como un grupo hidrato de carbono, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, o un conector para conjugación, funcionalización, u otra modificación, etc. Los oligopéptidos en los polímeros de la presente invención normalmente comprenden de 3 a 20 restos de aminoácidos, más preferentemente de 3 a 10 restos de aminoácidos, más preferentemente de 3 a 6
30 restos de aminoácidos. Alternativamente, los oligopéptidos en los polímeros de la presente invención pueden comprender de 4 a 20 restos de aminoácidos, más preferentemente de 4 a 10 restos de aminoácidos, más preferentemente de 4 a 6 restos de aminoácidos.

35 En el presente documento, el término “biocompatible” describe una sustancia que puede insertarse o inyectarse en un sujeto vivo sin causar una respuesta adversa. Por ejemplo, no produce inflamación o rechazo agudo por el sistema inmunitario que no

pueda ser adecuadamente controlado. Se reconocerá que "biocompatible" es un término relativo, y cabe esperar cierto grado de respuesta inmunitaria incluso para sustancias que son altamente compatibles con el tejido vivo. Un prueba *in vitro* para evaluar la biocompatibilidad de una sustancia es exponerla a las células; sustancias
5 biocompatibles normalmente no producirán muerte celular significativa (por ejemplo, >20 %) a concentraciones moderadas (por ejemplo, 29 g/10⁴ células).

En el presente documento, el término 'biodegradable' describe un polímero que se degrada en un entorno fisiológico para formar monómeros y/u otros restos no
10 poliméricos que pueden ser reutilizados por las células o desechados sin efecto tóxico significativo. La degradación puede ser biológica, por ejemplo, por actividad enzimática o maquinaria celular, o puede ser química, normalmente un proceso químico que tiene lugar en condiciones fisiológicas. La degradación de un polímero puede producirse a
15 velocidades variables, con una semivida en el orden de días, semanas, meses, o años, dependiendo del polímero o copolímero usado. Los componentes preferentemente no inducen inflamación u otros efectos adversos *in vivo*. En ciertas realizaciones preferidas, las reacciones químicas basadas en la descomposición de los compuestos biodegradables están sin catalizar.

20 El término "ARNm", como se usa en el presente documento, representa ácido ribonucleico mensajero y se refiere a una forma de ARN, transcrita de una única cadena de ADN que lleva información genética requerida para la síntesis de proteínas de ADN a los ribosomas. El ARNip se llama ARN interferente pequeño, ARN interferente corto o ARN de silenciamiento y es una clase de moléculas de ARN
25 bicatenario que operan dentro de la vía de interferencia por ARN. El término "miARN" significa micro ARN y define una clase de moléculas de ARN no codificantes pequeñas que existen de forma natural que son parcialmente complementarias a uno o más ARN mensajero (ARNm) y cuya función principal es regular por disminución la expresión génica en una variedad de maneras.

30 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. Pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el
35 presente documento en la práctica de la presente invención. En toda la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Objetos, ventajas y

características adicionales de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden ser aprendidos por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

5

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Comparación de las eficiencias de transfección en células Cos-7: se incubaron células Cos-7 con nanopartículas que contienen SPION C32-CR3:pGFP (50:1) de tipo S y M y tras 2 días se analizaron por FACS (citometría de flujo activada por fluorescencia) para determinar la fracción de células positivas indicadoras. (NP) Las barras blancas ilustran valores para control sin SPION (solo pBAE + pADN), (C+) células tratadas con Lipofectamine® y (C-) células sin tratar. Los valores 0,5, 2,5 y 5 se refieren a la concentración de SPION en las nanopartículas multicomponente (en $\mu\text{g/ml}$).

FIG. 2. Comparación de las eficiencias de transfección en células U87: se incubaron células U87 con nanopartículas que contienen SPION C32-CR3:pGFP (50:1) de tipo S y M como se ha descrito y tras 2 días se analizaron por FACS para determinar la fracción de células positivas indicadoras. (NP) Las barras blancas ilustran valores para control sin SPION, (C+) células tratadas con Lipofectamine® y (C-) células sin tratar. Los valores 0,5, 2,5 y 5 se refieren a la concentración de SPION en las nanopartículas multicomponente (en $\mu\text{g/ml}$).

FIG. 3. Comparación de la eficiencia de transfección en células HeLa: se incubaron células HeLa con nanopartículas que contienen SPION C32-CR3:pGFP (50:1) de tipo S y M como se ha descrito y tras 2 días se analizaron por FACS para determinar la fracción de células positivas indicadoras. (NP) Las barras blancas ilustran valores para control sin SPION, (C+) células tratadas con Lipofectamine® y (C-) células sin tratar. Los valores 0,5, 2,5 y 5 se refieren a la concentración de SPION en las nanopartículas multicomponente (en $\mu\text{g/ml}$).

FIG. 4. Clasificación magnética de células HeLa tratadas con nanopartículas de tipo S y de tipo M. Después del análisis FACS, las diferentes fracciones de cada muestra se representan en términos de porcentaje en peso del total. Los valores son la media \pm EEM de experimentos llevados a cabo por triplicado. (NP) control sin SPION, (C+) células tratadas con Lipofectamine® y (C-) células sin tratar. Las cuatro categorías

representadas son las siguientes: (a) células que expresan GFP y magnéticamente
 marcadas (GFP+SP+); (b) células que expresan GFP pero no magnéticamente
 marcadas (GFP+SP-); (c) células que no expresan GFP pero magnéticamente
 marcadas (GFP-SP+); y (d) células que ni expresan GFP ni son magnéticas (GFP-SP-
 5).

FIG. 5. Muestra esquemáticamente el proceso de clasificación magnética de células.

FIG. 6. Los espectros de RMN ^1H del polímero pBAE C32 sintetizado en el Ejemplo
 10 1.1.

FIG. 7. Los espectros de RMN ^1H del polímero pBAE C6 sintetizado en el Ejemplo 1.1.

FIG. 8. Los espectros de RMN ^1H de pBAE modificados en los extremos con
 15 oligopéptido: pBAE C32-CR3 o C6-CR3 sintetizados en el Ejemplo 1.2.

FIG. 9. Los espectros de RMN ^1H de pBAE modificados en los extremos con
 oligopéptido: pBAE C6-CR3 sintetizado en el Ejemplo 1.1.

FIG. 10. Representación esquemática de las nanopartículas de "tipo M" y "tipo S" de la
 presente invención. Se representan los tres componentes: nanopartículas de óxido de
 hierro superparamagnético (SPION), el poli(beta-amino éster) modificado en los
 extremos con al menos un oligopéptido y que tiene una masa molecular entre 1.000 y
 10.000 Da (pBAE) y el polinucleótido (pADN).

25

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen el procedimiento para la fabricación de
 nanopartículas multicomponente, transfección y separación magnética de células.

30

Materiales y reactivos

Para la preparación de nanopartículas:

- pBAE modificados con oligopéptidos
- SPION
- 35 - Solución de pGFP ADN
- Tampón acetato sódico 25 mM

Para el cultivo y transfección celular:

- Células Cos-7, U87 y HeLa
 - DMEM (D5671 Sigma Aldrich)
 - Suero bovino fetal
 - Solución de penicilina / estreptomicina 100X (N.º L0022, Biowest)
 - 5 - L-Glutamina 100X (N.º X0550, Biowest)
 - Solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) 1X
 - Lipofectamine ®3000 (Invitrogen de Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)
 - Tripsina-EDTA
 - 10 - Paraformaldehído filtrado (PFA, 0,22 µm, 2 % en PBS)
- Para la separación magnética de células:
- Columnas MS (Miltenyi Biotec)
 - Solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) 1X
 -

15 **Ejemplo 1: Formación de nanopartículas multicomponente**

1.1. Síntesis de pBAE: pBAE C32 y C6.

Se sintetizó el polímero pBAE C32 siguiendo un procedimiento de dos etapas. Se
 20 añadió un exceso de diacrilato de 1,4-butanodiol, denominado C (2 g, 10,1 mmoles), al
 reactivo limitante 5-amino-1-pentanol, el llamado 32 (0,86 g, 8,4 mmoles), y los dos
 reactivos se polimerizaron a 90 °C en una atmósfera inerte de N₂ y con agitación
 magnética durante 12 h. La polimerización consiste en una reacción de adición de
 25 5 mg de pBAE sintetizado en 1 ml de cloroformo deuterado (CHCl₃), y la muestra
 resultante se analizó por ¹H-RMN (resonancia magnética nuclear de protones) para
 confirmar la estructura del polímero. Los espectros de RMN se registraron en un 400
 MHz Varian (Varian NMR Instruments, Clarendon Hills, IL). (véase la FIG. 7)

30 Se sintetizó el polímero pBAE C6 por polimerización de diacrilato de 1,4-butanodiol (2
 g, 10,1 mmoles), 5-amino-1-pentanol (0,43 g, 4,2 mmoles) y 1-hexilamina (0,42 g,
 4,2 mmoles) en una atmósfera inerte de N₂ y con agitación magnética durante 12 h
 (una relación molar 1,2:0,5:0,5). Entonces, se disolvieron 5 mg de pBAE sintetizado en
 35 1 ml de cloroformo deuterado (CHCl₃), y la muestra resultante se analizó por ¹H-RMN
 para confirmar la estructura del polímero (véase la FIG. 8).

1.2. Síntesis de pBAE modificados en los extremos con oligopéptidos: pBAE C32-CR3

o C6-CR3 (pBAE modificados en los extremos con tri-arginina terminada con tiol).

Se obtuvieron pBAE modificados en los extremos con tri-arginina C32-CR3 o C6-CR3, por modificación terminal del polímero C32/C6 terminado en acrilato con oligopéptido de tri-arginina terminado en tiol (una relación molar 1:2,5). Se añadió una solución de 2 ml de pBAE C32/C6 (0,1 g, 0,046 mmoles) en DMSO a una disolución de 2 ml de Cys-Arg-Arg-Arg-CONH₂·HCl (CR3, 0,085 g, 0,11 mmoles) en DMSO. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El polímero C32-CR3 o C6-CR3 modificado en los extremos se obtuvo mediante precipitación en una mezcla 70:30 v/v de dietil éter y acetona. Entonces, se disolvieron 5 mg de pBAE modificado en 1 ml de metanol deuterado, y la muestra resultante se analizó por ¹H-RMN para confirmar la modificación terminal de los extremos de acrilato de C32/C6 (véanse las FIG. 9 y 10).

1.3. Síntesis de nanopartículas de ADN (pGFP)/pBAE convencionales

Se emplearon nanopartículas de ADN/pBAE convencionales como controles en la mayoría de los experimentos de transfección de este trabajo. Para formar tales poliplejos, se emplearon pBAE C32 y C6 modificados con oligopéptido. Las relaciones entre pBAE C32 y C6 y pADN ya han sido estudiadas (datos del grupo todavía no publicados). Brevemente, se demostró que C32-CR3 encapsulaba eficientemente pGFP a una relación 50:1 (polímero:ADN) p/p, mientras que C6-CR3 lo hizo a una relación 25:1 p/p.

Se diluyeron disoluciones madre de pBAE en DMSO en tampón acetato sódico (25 mM, pH 5,5) a concentraciones apropiadas para obtener las relaciones de polímero/ADN (p/p) deseadas. Se añadió una solución de plásmido pGFP (50 µl a 0,06 µg/µl en acetato tampón) a una solución de pBAE apropiadamente diluida (50 µl en tampón acetato). La solución final se mezcló usando una pipeta y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Las nanopartículas se precipitaron en medio Eagle modificado por Dulbecco sin suero (DMEM, 4,5 g de glucosa/ml sin glutamina, pH = 7,2) antes de cada transfección o en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 1X, pH = 7,4) antes de su análisis de DLS.

1.4. Síntesis de nanopartículas de ADN/pBAE/SPION

1.4.1 Síntesis de 50 µl de nanopartículas que contienen SPION C32-CR3:pGFP (50:1)

de "tipo S" a 5 µg de SPION/ml

Se cargó un tubo Eppendorf con 25 µl de solución de pGFP ADN de en tampón acetato sódico 25 mM para conseguir una concentración de 3×10^{-2} µg de ADN/µl. Se cargó otro tubo Eppendorf con 0,75 µl de C32-CR3 a 100 mg/ml diluido en tampón acetato sódico 25 mM; 25 µl de volumen final. El Eppendorf que contenía la solución de ADN se homogeneizó con una micropipeta y su contenido completo (25 µl) se añadió al Eppendorf que contenía el polímero, que acabada de ser agitado con vórtex durante 10 segundos. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Entonces, la mezcla de nanopartículas se diluyó 10 veces con DMEM y se añadió el volumen necesario de SPION con el fin de tener una concentración final de 5 µg de SPION/ml.

1.4.2 Síntesis de 50 µl de nanopartículas que contienen SPION C32-CR3:pGFP (50:1) de "tipo S" a 5 µg de SPION/ml

La síntesis de 50 µl de nanopartículas que contienen SPION C32-CR3:pGFP (50:1) de tipo M a 5 µg de SPION/ml se realiza secuencialmente. Primero, se recubren SPION con la mitad del volumen total de polímero requerido para sintetizar un lote de tipo S equivalente de nanopartículas (12,5 µl). Entonces, se añade la solución de ADN (25 µl de 3×10^{-2} µg de ADN/µl) y se incuba a 37 °C durante 30 min. Y finalmente se obtiene la segunda capa de polímero mediante la adición de los 12,5 µl restantes de pBAE sobre la mezcla.

Ejemplo 2: Transfección de células (experimentos *in vitro*)

Se usaron diferentes líneas celulares en el presente trabajo, todas ellas obtenidas de ATCC:

- Las células Cos-7 son fibroblastos derivados de tejido de riñón de mono verde africano.
- Las células U-87 MG son células de glioblastoma primario humano con morfología epitelial. Esta línea celular se obtuvo de un paciente con cáncer de 44 años de edad de etapa IV.
- Las células HeLa derivan de un cáncer de cuello uterino tomadas de una paciente de 31 años de edad.

Todas las líneas celulares se descongelaron y se cultivaron en placas de cultivo celular. Los medios de cultivo de estas 3 líneas celulares fueron DMEM (4,5 g de

glucosa/ml sin glutamina, pH = 7,2) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Hyclone, Utah EE.UU.), 1 % de mezcla de penicilina/estreptomicina y el aminoácido glutamina. Las células se cultivaron en estufas de incubación a 37 °C con 5 % de atmósfera de CO₂ durante los pases sucesivos, la mayoría de las veces a la relación 1:5 cada 2 o 3 días. Dependiendo del experimento, las células se cultivaron en placas de 6, 12, 24 o 96 pocillos, siendo estas últimas una de las más frecuentemente usadas. Los pases de células de mantenimiento se hicieron en placas de cultivo celular de poliestireno de 100 x 20 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

10

Transfección de células

Para una placa de 96 pocillos, el procedimiento detallado de transfección fue del siguiente modo. Se sembraron células en la placa a una concentración de 4x10⁴ células/cm². Las células sembradas se incubaron a 37 °C en 5 % de atmósfera de CO₂ durante 24 h antes de la transfección. Se prepararon nanopartículas de pBAE/ADN que contenían SPION como se ha descrito anteriormente usando pGFP. Se nanoprecipitaron poliplejos (nanopartículas que comprenden SPION y pBAE y cargadas con material genético) y se diluyeron en DMEM sin suero a una concentración final de 1,5 µg de pGFP/ml. Entonces, las células se lavaron con PBS y se añadieron 200 µl de la solución de nanopartículas a cada pocillo a una concentración de pGFP final de 0,3 µg/pocillo. Las células se incubaron durante 2 h a 37 °C en 5 % de atmósfera de CO₂. Posteriormente, se eliminó el medio de transfección y se añadió medio complementado fresco a las células. Veinticuatro horas después, se observó la expresión de GFP por microscopía de fluorescencia y 48 h después de la transfección, las células se incubaron durante 5 min con tripsina-EDTA a 37 °C en 5 % de atmósfera de CO₂ y se fijaron con paraformaldehído previamente filtrado (PFA, 0,22 µm, 2 % en PBS). La expresión de GFP se cuantificó por citometría de flujo (analizador de células BD LSRFortessa) y se comparó contra un control negativo de células sin tratar y un control positivo de Lipofectamine® 3000 (Invitrogen de Life Technologies, Thermo Fisher Scientific).

Como un ejemplo, células Cos-7 tratadas con diferentes tipos de nanopartículas que contienen SPION muestran porcentajes más altos de eficiencia de transfección cuando se comparan con nanopartículas sin estos componentes magnéticos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

35

Experimentos equivalentes usando células de glioma U-87 mostraron eficiencias de transfección más bajas, que ilustran las diferentes susceptibilidades de transfección de los diferentes tipos de células. Sin embargo, la eficiencia de transfección de los poliplejos basados en C32-CR3 en estas células estuvo significativamente potenciada con respecto a los controles por la presencia de SPION a 5 µg/ml (Figura 2).

Se proporcionó una ilustración adicional de la eficiencia de transfección dependiente de células por los intentos de los presentes inventores para transfectar células HeLa con el sistema mejorado de los presentes inventores. La Figura 3 muestra que la eficiencia de transfección de poliplejos de C32-CR3 aumentó sorprendentemente cuando se añadieron 2,5 o 5 µg de SPION/ml a las S-nanopartículas o cuando se añadieron 5 µg de SPION/ml a M-nanopartículas. A la concentración de SPION más alta, S y M mostraron la misma eficiencia de transfección. Sin embargo, a las concentraciones más bajas, las S-nanopartículas produjeron un nivel de transfección más alto.

Ejemplo 3: Separación magnética de células transfectadas

Columnas MS (Miltenyi Biotec S.L., Bergisch Gladbach, Alemania) comprenden una matriz de esferas ferromagnéticas cubiertas con un recubrimiento apto para las células para permitir la rápida y suave separación de células. Cuando se ponen en un campo magnético, las esferas amplifican el campo magnético 10^5 veces, induciendo así un alto gradiente dentro de la columna. El espacio entre las esferas es varias veces mayor que el primario y la mayoría de las células cultivadas permiten el flujo libre de células a través de la columna. Células magnéticamente marcadas se mantienen en suspensión dentro de la columna y en realidad no “se unen” a la matriz de la columna. Esta suspensión minimiza el estrés sobre las células y permite el eficiente lavado estéril que evita la agregación de células. Pueden usarse columnas MS para separar material inferior a 30 µm de tamaño y se empaquetan individualmente de una forma estéril.

Después de la transfección con nanopartículas de tipo S y M que contienen SPION, se tripsinaron células Cos-7 o HeLa y se fijaron. Entonces se clasificaron usando columnas MS (Miltenyi Biotec). Para estos experimentos de clasificación, se emplearon placas de células más grandes (normalmente placas de 24 pocillos). Para cada muestra, se usó una columna nueva. En primer lugar, la columna se puso en contacto directo con imanes fuertes y se equilibró cargando 1 ml de PBS previamente

filtrado. La muestra se cargó entonces y la fracción eluida (células no magnéticas) se recogió en un tubo Falcon. Entonces se retiró el imán, la columna se puso en otro tubo Falcon y la fracción retenida (células magnéticas) se eluyó añadiendo 2 ml de PBS y presionando el émbolo. Así, se obtuvieron dos fracciones de cada muestra clasificada.

5

Aparte de las muestras clasificadas, también se prepararon duplicados que no se clasificaron. Entonces, estas muestras no clasificadas junto con las fracciones magnéticas y no magnéticas de cada muestra clasificada se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó hasta que solo se dejaron 200 μ l de medio o PBS y se resuspendió el sedimento. Este volumen se dispuso en una placa de 96 pocillos y la placa se analizó por FACS (citometría de flujo activada por fluorescencia) en términos de expresión de GFP y número de células. De esta forma, se pudo determinar qué fracción de células estaba magnéticamente marcada y qué porcentaje de esta fracción fue eficazmente transfectado. En otras palabras, se fue capaz de determinar si los SPION y los complejos de ADN/pBAE entraron juntos en las células o no.

10

15

La Figura 5 representa esquemáticamente el proceso de clasificación magnética de células.

20

En la Figura 4 se muestra el porcentaje de cada fracción de células obtenida después de la separación magnética y posterior procedimiento de FACS. En este caso, se trataron células HeLa con nanopartículas donde los pBAE (C6) y las partículas magnéticas se acoplaron por interacciones electrostáticas. La fracción de células magnéticas que también expresa GFP representó casi el 80 % en el caso de las células tratadas con S-nanopartículas. En el caso de las células tratadas con M-nanopartículas, aproximadamente el 60 % de las células fueron magnéticas y verde fluorescentes (han ocurrido tanto la transfección como el marcado magnético).

25

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula multicomponente caracterizada por que tiene dimensiones de partícula entre 1 y 1.000 nanómetros y comprende:
 - 5 a) nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) que tienen dimensiones de partícula entre 20 y 100 nanómetros,
 - b) un polímero que es un poli (beta-amino éster) (pBAE) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido, dicho polímero tiene una masa molecular entre 1.000 y 10.000 Da y
 - 10 c) un polinucleótido,
donde la relación en peso entre el polímero y el polinucleótido es entre 25:1 y 200:1 y la relación en peso entre el polímero y SPIONs es entre 200:1 y 700:1.

2. Nanopartícula multicomponente según la reivindicación 1, en la que las
15 dimensiones de partícula son entre 50 y 500 nm.

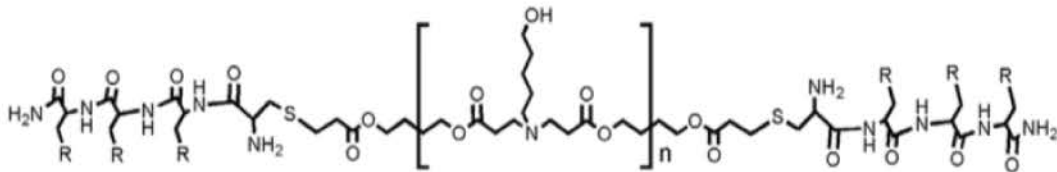
3. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que el poli(beta-amino éster) modificado en los extremos con al menos un oligopéptido tiene una masa molecular entre 2.000 y 3.000 Da.
20

4. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que la relación entre el polímero y el polinucleótido es entre 50:1 y 100:1.

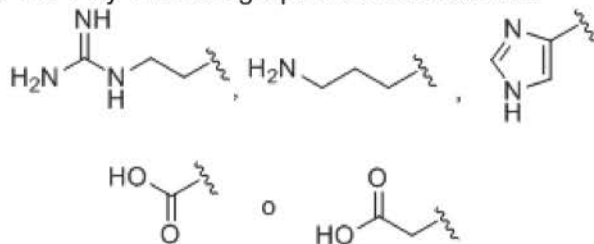
- 25 5. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que el oligopéptido en el polímero comprende preferentemente al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico.

- 30 6. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que el poli(beta-amino éster) está modificado con al menos un oligopéptido que comprende tres aminoácidos iguales.

7. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones
35 previas, en la que el poli(beta-amino éster) tiene la fórmula:



en la que n oscila de 4 a 14 y R es un grupo seleccionado de:



- 5 8. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que el polinucleótido es ADN.
9. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que el polinucleótido es un plásmido de ADN.
- 10 10. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que comprende un núcleo de óxido de hierro superparamagnético, una primera capa de polímero que encapsula el núcleo; una capa de polinucleótido y una segunda capa de polímero, en la que la capa de polinucleótido está entre las capas de
- 15 polímero.
11. Nanopartícula multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el polinucleótido está encapsulado por una capa que comprende el polímero y las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION).
- 20 12. Nanopartícula multicomponente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en medicina.
13. Nanopartícula multicomponente según la reivindicación 12 para la transfección
- 25 de células.
14. Composición que comprende nanopartícula multicomponente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Célula que comprende una nanopartícula multicomponente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

16. Uso de la nanopartícula multicomponente como se define en cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 11 para la transfección de células.

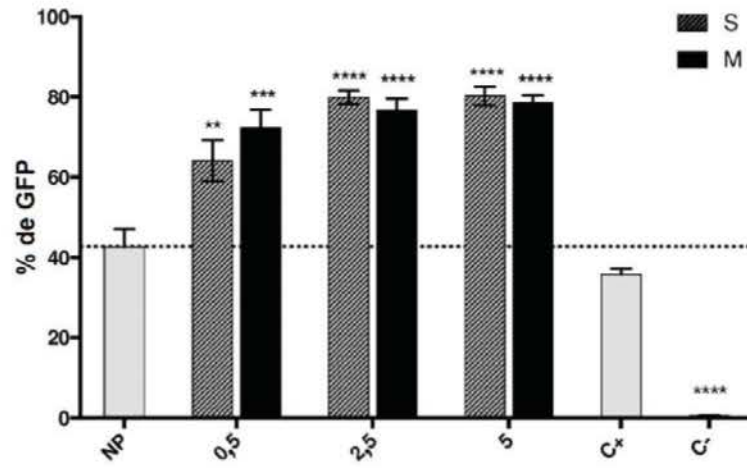


FIG. 1

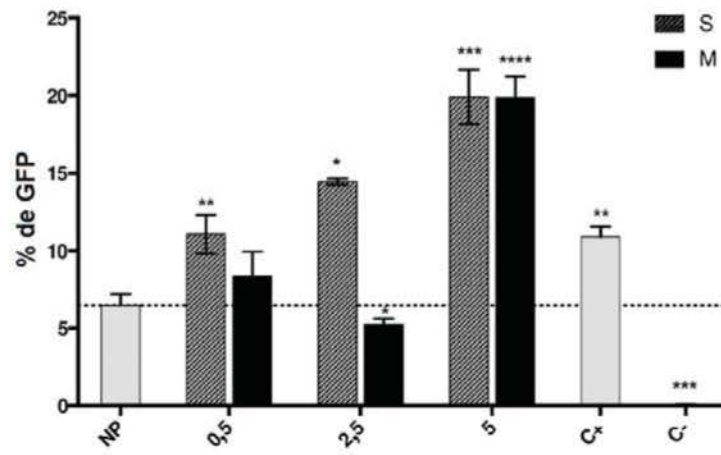


FIG. 2

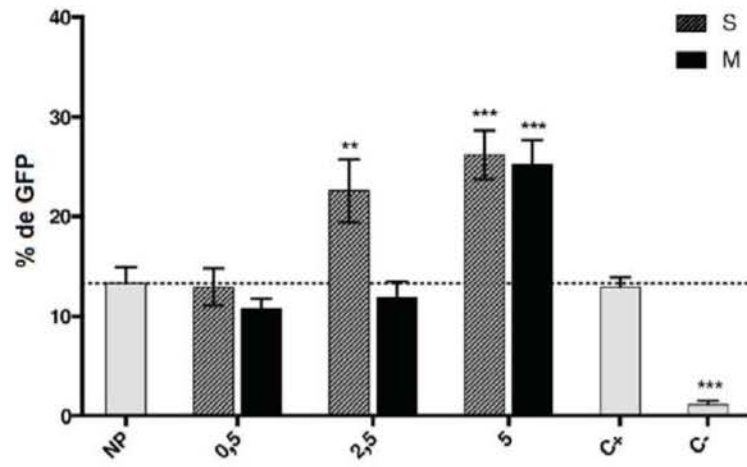


FIG. 3

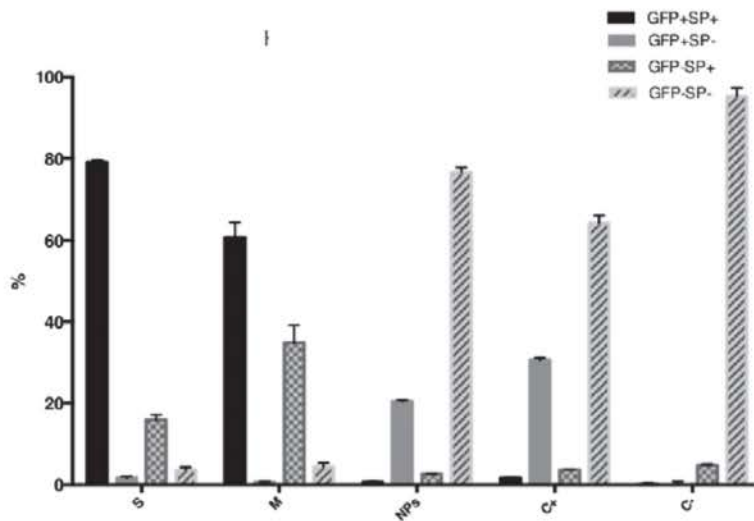


FIG. 4

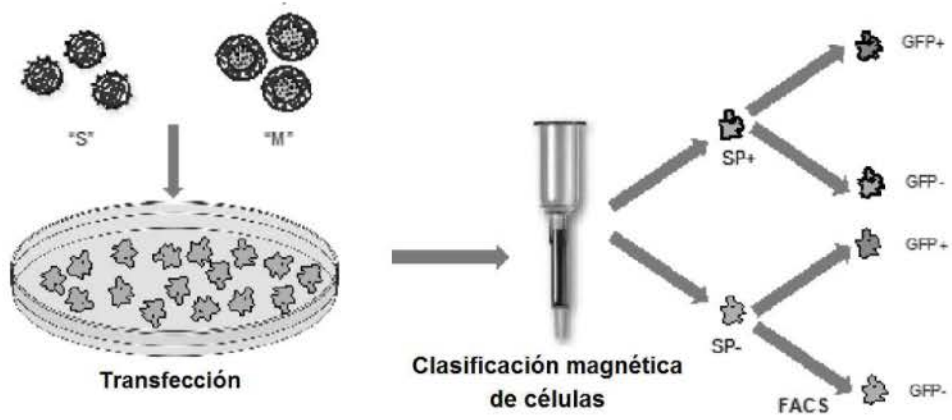


FIG. 5

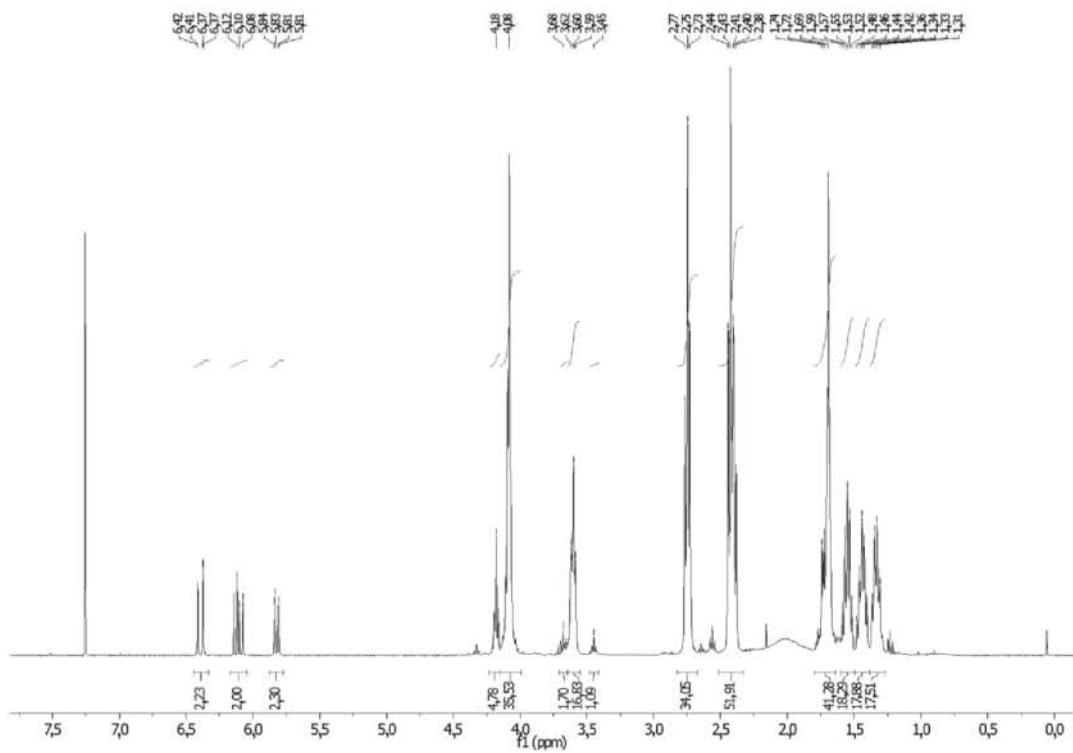


FIG. 6

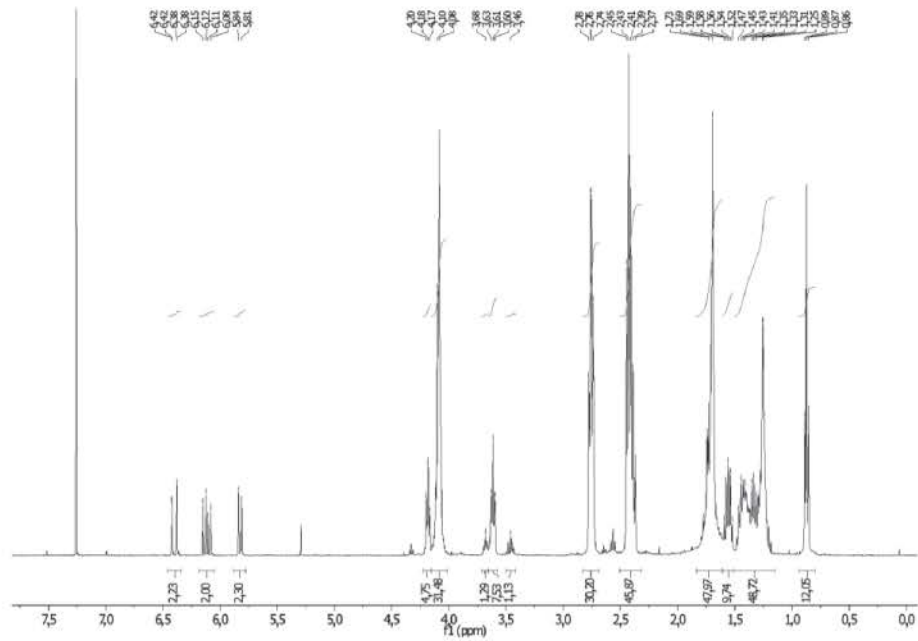


FIG. 7

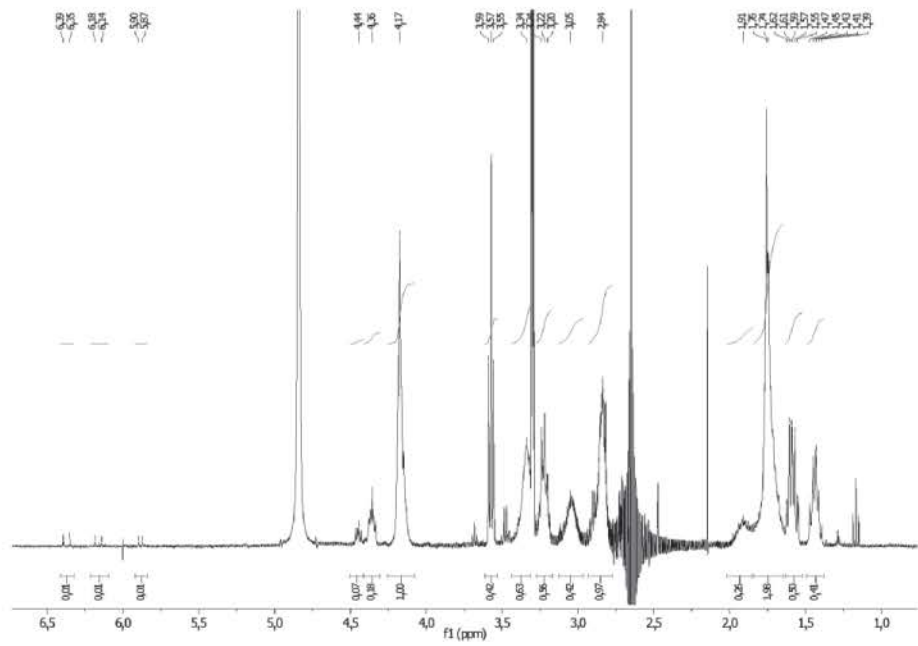


FIG. 8

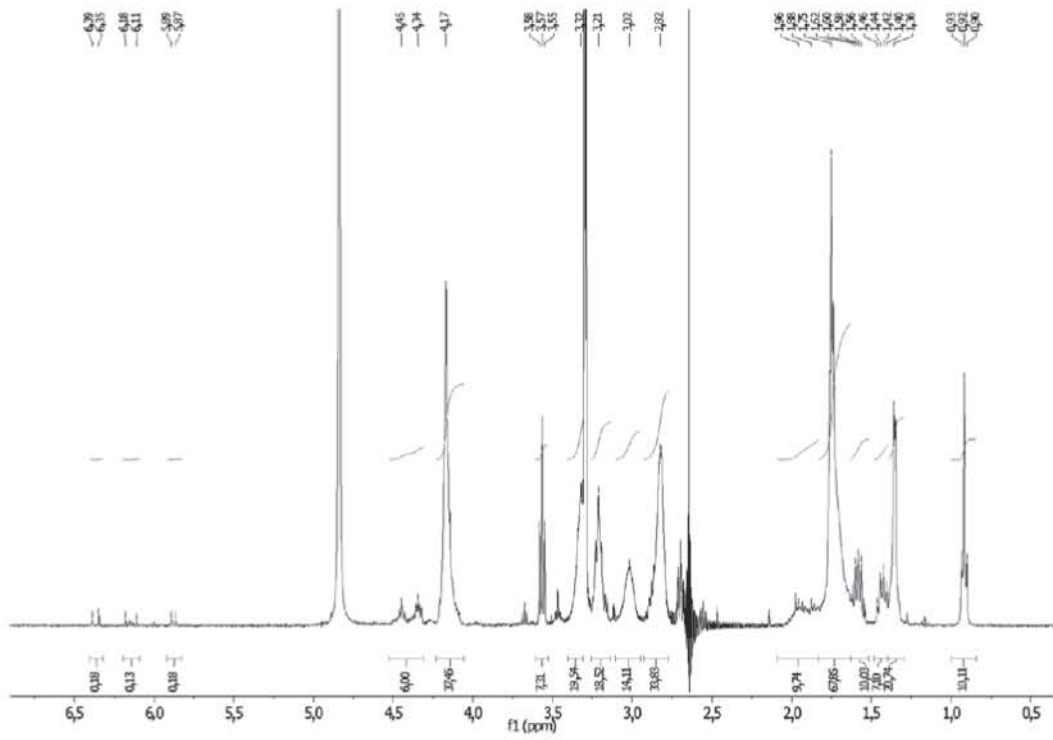


FIG. 9

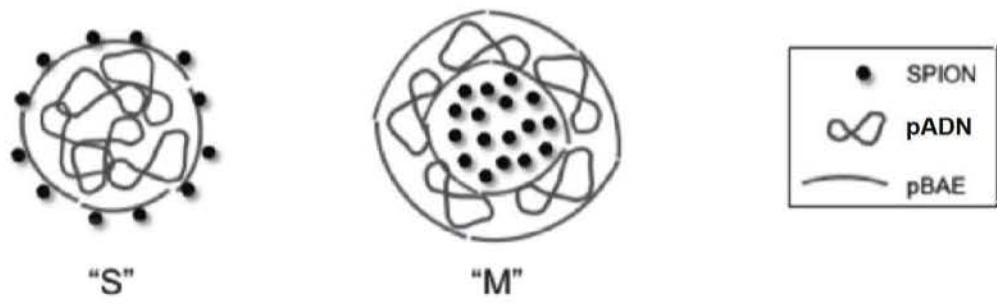


FIG. 10



- ② N.º solicitud: 201830507
② Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2018
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHEN FANG, et al., Fabrication of magnetic nanoparticles with controllable drug loading and release through a simple assembly approach, JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 18/06/2012, Vol. 162, N.º 1, páginas 233-241, ISSN 0168-3659, <DOI: doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.028>. Resumen.	1-16
A	WO 2013049531 A2 (UNIV SOUTH FLORIDA) 04/04/2013, ejemplo 1.	1-16
A	WYDRA, R.J., Surface functionalized magnetic nanoparticles for cancer therapy applications, Tesis doctoral, University of Kentucky, Lexington, KY, USA, 2015, páginas 107-120, recuperado de Internet <URL: http://gateway.proquest.com/openurl?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&res_dat=xri:pqm&rft_dat=xri:pqdiss:3718310 >. Apartado 7.	1-16
A	DOSTA, P., et al., Surface charge tunability as a powerful strategy to control electrostatic interaction for high efficiency silencing, using tailored oligopeptide-modified poly(beta-amino ester)s (PBAEs), Acta Biomaterialia, 01/04/2015, Vol. 20, páginas 82-93. Párrafo: "Nanoparticle formation and biophysical characterization".	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
13.02.2019

Examinador
M. d. García Poza

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/59 (2017.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

C08G73/02 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

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

A61K, C08G, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, INSPEC, XPESP, COMPENDEX