

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
28 de junio de 2012 (28.06.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2012/085318 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*A61K 9/51* (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

Miguel Hernández de Elche, Avda. de la Universidad, s/n,  
E-03202 Elche (Alicante) (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2011/070883

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L.,  
Avenida de Burgos, 16D: Edificio Euromor, E-28036  
Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:  
20 de diciembre de 2011 (20.12.2011)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201031897  
21 de diciembre de 2010 (21.12.2010) ES

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*):  
**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO** [ES/ES]; Barrio Sarriena, s/n, E-48940 Leioa (Vizcaya) (ES).  
**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE** [ES/ES]; Avda. de la Universidad, s/n, E-03202 Elche (Alicante) (ES).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):  
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*):  
**RODRÍGUEZ GASCÓN, Alicia** [ES/ES]; Universidad del País Vasco, Edificio Rectorado, OTRI, Barrio Sarriena, s/n, E-48940 Leioa (Vizcaya) (ES). **SOLINÍS ASPIAZU, María Angeles** [ES/ES]; Universidad del País Vasco, Edificio Rectorado, OTRI, Barrio Sarriena, s/n, E-48940 Leioa (Vizcaya) (ES). **DEL POZO RODRÍGUEZ, Ana** [ES/ES]; Universidad del País Vasco, Edificio Rectorado, OTRI, Barrio Sarriena, s/n, E-48940 Leioa (Vizcaya) (ES). **DELGADO SAN VICENTE, Diego** [ES/ES]; Universidad del País Vasco, Edificio Rectorado, OTRI, Barrio Sarriena, s/n, E-48940 Leioa (Vizcaya) (ES). **FERNÁNDEZ JOVER, Eduardo** [ES/ES]; Universidad

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: LIPID NANOPARTICLES FOR TREATING OCULAR DISEASES

(54) Título : NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES OCULARES

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a system of lipid nanoparticles that includes a nucleic acid, a lipid component, a cationic surfactant, an ionic surfactant, a polysaccharide and optionally, a positively charged peptide, for treating and preventing ocular diseases.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el uso de un sistema de nanopartículas lipídicas que comprenden un ácido nucleico, un componente lipídico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo iónico, un polisacárido y, opcionalmente, un péptido de carga positiva, para el tratamiento y prevención de enfermedades oculares.



WO 2012/085318 A1

## NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES OCULARES

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de un sistema de nanopartículas lipídicas  
5 útiles para transfectar material genético en la prevención o tratamiento de enfermedades  
oculares.

### ANTECEDENTES

En los últimos años la terapia génica se ha erigido como una importante  
alternativa en el tratamiento de enfermedades, ya sean hereditarias o adquiridas. Aunque  
10 la terapia génica se propuso inicialmente como método de tratamiento de enfermedades  
hereditarias causadas por la mutación de un solo gen, es decir, de enfermedades  
monogénicas (fibrosis quística, hemofilia, enfermedad de Fabry retinopatías, etc), hoy  
en día se considera un método útil para el manejo de trastornos tanto hereditarios como  
adquiridos (cáncer, SIDA, enfermedades neurodegenerativas, etc).

15 La terapia génica consiste en la introducción de material genético (ADN, ARN o  
secuencias antisentido) en células diana con el fin de modular la expresión de  
determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno  
biológico que provoca la alteración de las mismas. Para desarrollar un producto que  
logre la adecuada vehiculización de dicho material se debe considerar la enfermedad a  
20 tratar, el gen terapéutico a administrar y el sistema de administración de ese gen. Éste ha  
de ser capaz de proteger el material genético frente a la degradación enzimática, facilitar  
la captación celular y la posterior liberación en el citoplasma celular.

Uno de los grupos de enfermedades más apropiados y atractivos para la  
aplicación de la terapia génica es el que corresponde a las enfermedades degenerativas  
25 de la retina, puesto que actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para la mayor  
parte de las mismas. A las nocivas características de estas enfermedades como son su  
carácter hereditario, su evolución progresiva y su falta de tratamiento, se le suma la  
idoneidad del ojo como diana para la aplicación de la terapia génica. Este órgano reúne  
una serie de condiciones como su fácil accesibilidad y su privilegiado entorno inmune,  
30 que lo señalan como uno de los más prometedores para este tipo de terapia.

Hasta la fecha, numerosos estudios han abordado el empleo de sistemas de administración virales para el tratamiento de estas enfermedades con mayor o menor éxito. En general, los sistemas de administración de genes pueden clasificarse en vectores virales o no virales. Los vectores virales son los más efectivos, pero los  
5 vectores no virales son mucho más seguros, su producción es más sencilla y más barata y no presentan una limitación en cuanto al tamaño del material genético a administrar. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos medicamentos para terapia génica basados en vectores no virales seguros que sean capaces de mejorar su eficacia de transfección.

10 Si se consigue aumentar la eficacia de los sistemas de administración no viral, estos pueden presentar una seria alternativa a los vectores virales ya que solucionarían los problemas que supone el uso de estos últimos: riesgo de toxicidad, inmunogenicidad y mutagénesis derivada de una incorrecta inserción del gen administrado en el genoma del paciente, limitación del tamaño del material genético a transfectar o dificultades en  
15 los procesos de preparación de los sistemas.

En este sentido, los sistemas basados en nanopartículas han mostrado ser útiles como sistemas de transfección. Existen en la literatura diversos documentos que describen el empleo de nanopartículas lipídicas como vectores para el transporte de material genético. En particular, WO 2005/120469 y el documento de *Del Pozo-Rodríguez et al.* (*Int. J. Pharm.* 2008, 360, 177-183) hacen referencia a sistemas de  
20 nanopartículas lipídicas que incorporan tensioactivos iónicos para la transfección de ácidos nucleicos. El documento de *Del Pozo-Rodríguez et al.* (*J. Control. Rel.*, 2009, 133, 52-59) describe sistemas de nanopartículas lipídicas que se encuentran recubiertas además con un péptido. No obstante, la mayoría de estos sistemas presentan como  
25 principal desventaja una baja eficacia de transfección.

A la vista de estos datos, existe, por tanto, una necesidad de desarrollar medicamentos para el tratamiento de enfermedades oculares mediante terapia génica que estén basados en vectores no virales seguros y con una adecuada eficacia de transfección.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han encontrado que un sistema de nanopartículas lipídicas que incorpora un polisacárido en su composición, permite conseguir un eficaz nivel de transfección de material genético en las células y una  
5 elevada viabilidad celular.

En este sentido, los estudios realizados por los inventores han demostrado la capacidad de este sistema de nanopartículas para transfectar y permitir la expresión del gen RS1, implicado en la retinoquinosi juvenil ligada al sexo, de forma efectiva. Además, ensayos *in vivo* han puesto de manifiesto la capacidad de este sistema para  
10 alcanzar las células de la retina, lo que demuestra la utilidad de este sistema en el tratamiento de enfermedades oculares.

Este sistema de nanopartículas ha sido capaz además de proteger el material genético de la acción de enzimas, en particular, de nucleasas, que están presentes en los fluidos biológicos, lo que evita su degradación o ruptura en este medio biológico,  
15 evitando así que el material genético se libere de las nanopartículas antes de alcanzar su objetivo final.

Así, en un primer aspecto la invención se dirige al uso de un sistema de nanopartículas, donde las nanopartículas comprenden:

- al menos un ácido nucleico;
  - 20 - al menos un lípido sólido a temperatura ambiente;
  - al menos un tensioactivo catiónico;
  - al menos un tensioactivo no iónico; y
  - al menos un polisacárido;
- para preparar un medicamento para la prevención o el tratamiento de  
25 enfermedades oculares.

Por otra parte, se ha observado que la incorporación del polisacárido junto con un péptido de carga positiva, permite aumentar de forma sinérgica los niveles de transfección cuando se compara con un sistema de nanopartículas que incluye únicamente el mencionado péptido o el polisacárido, así como mejorar la viabilidad  
30 celular tal como se recoge en los ejemplos aportados en esta solicitud. En consecuencia, un aspecto adicional de la presente invención lo constituye el uso de las nanopartículas

descritas anteriormente que comprenden además un péptido de carga positiva, para preparar un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades oculares.

Tanto el péptido como el resto de los componentes mencionados previamente se encuentran incorporados dentro de la estructura de las nanopartículas o bien adsorbidos  
5 sobre la superficie de las mismas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema de nanopartículas, donde las nanopartículas comprenden:

- al menos un ácido nucleico;
  - al menos un lípido sólido a temperatura ambiente;
  - 10 - al menos un tensioactivo catiónico;
  - al menos un tensioactivo no iónico;
  - al menos un polisacárido; y
  - opcionalmente al menos un péptido de carga positiva;
- para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades oculares.

15 Asimismo, la invención se dirige a un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades oculares que comprende la administración de un sistema de nanopartículas, donde las nanopartículas comprenden:

- al menos un ácido nucleico;
- al menos un lípido sólido a temperatura ambiente;
- 20 - al menos un tensioactivo catiónico;
- al menos un tensioactivo no iónico;
- al menos un polisacárido; y
- opcionalmente al menos un péptido de carga positiva.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Figura 1. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 2 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

Figura 2. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 3 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad  
30 de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

Figura 3. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 5 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

Figura 4. Gel de electroforesis obtenido con la formulación 6 en el que se muestra la capacidad de condensación del material genético de las nanopartículas (1), su capacidad de protección frente a DNAsas (2) y su liberación en presencia de SDS (3).

Figura 5. Nivel de transfección y viabilidad celular *in vitro* de las formulaciones 1, 2, 3 y DOTAP liposomal en células ARPE-19.

Figura 6. Fotografía de microscopía de fluorescencia que muestra el nivel de transfección y viabilidad celular *in vitro* de las formulaciones 1, 2, 3.

Figura 7. Nivel de transfección y viabilidad celular *in vitro* de las formulaciones 7-14 en células ARPE-19.

Figura 8. Expresión de la retinosquisina en células ARPE-19 detectada por la inmunohistoquímica usando las formulaciones 15 (izquierda) y 16 (derecha).

Figura 9. Cuantificación de la retinosquisina en células ARPE-19 expresada usando las formulaciones 15 y 16.

Figura 10. Fotografía de microscopía de fluorescencia en la que se muestra la expresión de EGFP en retina de rata tras la administración intravítrea de la formulación 3.

Figura 11. Fotografía de microscopía de fluorescencia en la que se muestra la expresión de EGFP en cornea de rata tras la administración tópica de la formulación 3.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El sistema de nanopartículas utilizado en la presente invención comprende nanopartículas, las cuales presentan una estructura que comprende una fase lipofílica y una fase hidrofílica, en la que puede incorporarse una molécula biológicamente activa.

Dichas nanopartículas se encuentran en un medio acuoso aunque, opcionalmente, pueden presentarse como productos liofilizados o desecados.

En el contexto de la presente invención, el término “nanopartícula” se refiere a una estructura que comprende un núcleo de naturaleza lipofílica rodeado por una fase hidrofílica que encapsula el núcleo. La interacción iónica resultante entre los distintos

componentes lipofílicos e hidrofílicos de la nanopartícula genera entidades físicas características, independientes y observables, cuyo tamaño medio es igual o inferior a 1  $\mu\text{m}$ , es decir, un tamaño medio comprendido entre 1 y 1000 nm.

Por “tamaño promedio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas, que comprenden la fase lipofílica y la fase hidrofílica. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental más adelante.

Las nanopartículas del sistema de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula igual o inferior a 1  $\mu\text{m}$ , preferentemente tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 1000 nm, más preferentemente entre 100 y 350 nm. Este tamaño permite a las nanopartículas penetrar en las células y administrar la molécula biológicamente activa. El tamaño medio de las nanopartículas se ve influenciado principalmente por la cantidad del componente lipídico (a cantidades mayores, el tamaño resultante es igual o mayor), por la cantidad de tensioactivos (a mayor cantidad o peso molecular el tamaño es igual o inferior), y por parámetros del procedimiento de preparación, tal como la velocidad y tipo de agitación, la temperatura de ambas fases o la duración de la fase de mezclado.

Por otra parte, las nanopartículas pueden presentar una carga superficial (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede variar desde -50 mV hasta +80 mV.

## 20 **Componente lipídico**

La formulación de nanopartículas de la presente invención comprende al menos un lípido sólido a temperatura ambiente que forma parte del núcleo de la nanopartícula.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “lípido sólido a temperatura ambiente” aquel lípido que se mantiene en forma sólida por debajo de 45  $^{\circ}\text{C}$ , pudiendo ser saturado o insaturado. En dicha definición, se incluyen triglicéridos (por ejemplo triestearina), mono o diglicéricos (por ejemplo Imwitor®), ácidos grasos (por ejemplo ácido esteárico), esteroides (por ejemplo colesterol) y ceras (por ejemplo cetil palmitato).

En una realización particular, el lípido sólido a temperatura ambiente se selecciona entre acilglicéridos, ácidos grasos saturados con una cadena de al menos 10 átomos de carbono o derivados de los mismos y mezclas de los mismos.

Los acilglicéridos incluyen tanto monoglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos como mezclas de los mismos. En una realización preferente los acilglicéridos se seleccionan entre palmitoestearato de glicerilo (Precirol® ATO5), monoestearato de glicerilo (Imwitor®900) y behenato de glicerilo (Compritol® 888ATO).

En una realización particular, los ácidos grasos son saturados y presentan una cadena de al menos 10 átomos de carbono. Asimismo, pueden emplearse derivados de estos ácidos grasos, entendiéndose como tales aquellos compuestos producidos como consecuencia de la reacción del grupo ácido con alcoholes o aminas, tales como por ejemplo los ésteres o amidas de dichos ácidos grasos. De la misma forma, se incluyen en la definición de derivados de ácidos grasos aquellos ácidos grasos, sus ésteres o sus amidas que presentan grupos hidroxilo como sustituyentes de la cadena hidrocarbonada.

En una realización preferente, se emplea como derivado de ácido graso el palmitoestearato de glicerilo (Precirol® ATO5).

En otra realización particular, las nanopartículas comprenden además otro componente lipídico, en concreto un lípido líquido a temperatura inferior a 45 °C, pudiendo ser saturado o insaturado. El lípido líquido a temperatura ambiente se selecciona entre aceites, ácidos grasos, triglicéridos y ésteres de ácidos grasos insaturados, o saturados que presentan una cadena de menos de 10 átomos de carbono, y sus mezclas (por ejemplo Miglyol®, aceite de soja, miristato de isopropilo, aceite de ricino). En una realización preferente, se emplea como lípido líquido Mygliol 212.

## **25 Tensioactivo catiónico**

La fase hidrofílica de las nanopartículas que rodea al núcleo lipofílico comprende un tensioactivo catiónico. La función de este componente es principalmente la de dotar a la nanopartícula de una carga positiva que permita su absorción a través de entornos biológicos de carácter catiónico o su adsorción sobre ellos.

Por el término “tensioactivo catiónico” se entiende aquél compuesto que presenta una parte hidrófoba y una parte hidrofílica, que en solución forma iones cargados positivamente y que permite conseguir una emulsión.

En una realización particular de la invención, el tensioactivo catiónico se selecciona entre sales de amonio primario, secundario, terciario y cuaternario, ya sean de estructura lineal o cíclica, y mezclas de las mismas, como por ejemplo sales de piridina o piperizina.

Asimismo, se pueden emplear derivados de estas sales de amonio. Como derivados de sales de amonio se entiende aquellas sales que incorporan en la misma estructura al menos dos grupos amino ya sean primario, secundario, terciario y/o cuaternario, tales como por ejemplo las sales de guanidina, piperazina e imidazol. En esta definición, estarían también comprendidas las sales de aminoácidos, tales como por ejemplo las sales de lisina, arginina, ornitina o triptófano. Asimismo, se encontrarían englobadas en esta definición aquellas sales de amonio en las cuales la carga positiva se encuentra sobre un átomo de fósforo, como por ejemplo Ditetradecyl (trimethylethylphosphonio) methylphosphonate iodide, Ditetradecyl (butyldimethylphosphonio) methylphosphonate iodide, Ditetradecyl (dimethylisopropylphosphonio) methylphosphonate iodide) o arsénico (Ditetradecyl (Trimethylarsonio) methylphosphonate Iodide, Dioleil (trimethylphosphonio) methylphosphonate iodide), en lugar de sobre el átomo de nitrógeno.

En una realización preferente de la presente invención, las sales de amonio son sales de tetraalquilamonio, sales de alquibencil dimetil amonio o sales de amonio heterocíclicas, más preferentemente son bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), o DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonio chloride).

### **Tensioactivo no iónico**

Las nanopartículas comprenden adicionalmente un tensioactivo no iónico cuyas funciones principales son controlar el tamaño de partícula y conferir estabilidad, evitando la ruptura de éstas y la formación de agregados.

Por el término “tensioactivo no iónico” se entiende aquél compuesto que presenta una parte hidrófoba y una parte hidrofílica que permite conseguir una emulsión.

En una realización particular de la presente invención el tensioactivo no iónico  
5 se selecciona entre polisorbatos, copolímeros de polietilenglicol y copolímeros de polipropilenglicol, como por ejemplo Tween, Span o Poloxamer.

### **Polisacárido**

El sistema de nanopartículas de la presente invención comprende adicionalmente un polisacárido cuyas funciones principales son facilitar la interacción de las  
10 nanopartículas con la superficie celular y modificar la carga superficial de la nanopartícula.

Este componente puede formar parte de la estructura de las nanopartículas o bien puede quedar adsorbido sobre la superficie de las mismas. Cuando el polisacárido forma parte de la estructura de las nanopartículas, éste se encuentra en la fase hidrofílica que  
15 rodea el núcleo lipofílico junto con el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

Alternativamente, el polisacárido puede formar un complejo junto con el ácido nucleico a incorporar en la formulación de nanopartículas mediante interacción iónica. Dicho complejo se pone en contacto con las nanopartículas previamente formadas, de manera que el complejo formado por el polisacárido y el ácido nucleico queda  
20 adsorbido sobre la superficie de dichas nanopartículas.

En una realización particular, el polisacárido se selecciona entre quitosanos, dextranos, ácido hialurónico, carragenano, condroitina, keratano, ácido colomínico, xantano, ciclodextrinas, sales, derivados y mezclas de los mismos. En una realización preferente, el polisacárido se selecciona entre dextrano, ácido hialurónico, carragenano,  
25 ácido colomínico y heparina.

De acuerdo con una realización particular, el polisacárido comprende la unión de al menos tres monosacáridos y, preferiblemente, se encuentra incorporado dentro de la estructura de las nanopartículas o bien absorbido sobre la superficie de las mismas.

Según otra realización, el polisacárido no es un lipopolisacárido.

En una realización de la presente invención, el polisacárido comprende la unión de al menos tres monosacáridos, con la condición de que dicho polisacárido no sea un lipopolisacárido, y donde dicho polisacárido se encuentra incorporado dentro de la estructura de las nanopartículas o bien absorbido sobre la superficie de las mismas.

## 5 Péptido de carga positiva

El sistema de nanopartículas de la invención puede comprender además un péptido de carga positiva, entendiéndose como tal aquel péptido que en disolución se ioniza dando lugar a carga neta positiva.

Los autores de la presente invención han observado que la combinación del  
10 polisacárido con el mencionado péptido de carga positiva permite aumentar de forma sinérgica los niveles de transfección así como mejorar la viabilidad celular, tal como se ha puesto de manifiesto en la transfección del plásmido pCMS-EGFP en la línea celular ARPE-19 de pigmento retinal humano.

Al igual que el polisacárido, el péptido de carga positiva puede formar parte de  
15 la estructura de las nanopartículas o bien puede quedar adsorbido sobre la superficie de las mismas. Cuando el péptido de carga positiva forma parte de la estructura de las nanopartículas, éste se encuentra en la fase hidrofílica que rodea el núcleo lipofílico junto con el tensioactivo catiónico, el tensioactivo no iónico y el polisacárido.

Alternativamente, el péptido de carga positiva puede formar un complejo junto  
20 con el polisacárido y el ácido nucleico a incorporar en la formulación de nanopartículas. Dicho complejo se pone en contacto con las nanopartículas previamente formadas, de manera que el complejo formado por el polisacárido, el péptido de carga positiva y el ácido nucleico queda adsorbido sobre la superficie de dichas nanopartículas.

En una realización particular de la presente invención, el péptido de carga  
25 positiva se selecciona entre péptidos de señalización nuclear (péptidos que dirigen hacia el núcleo) y péptidos de señalización mitocondrial (péptidos que dirigen hacia las mitocondrias), péptidos RGD (péptidos de reconocimiento de la superficie celular, que contienen la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico y variantes de la misma) y CPP (péptidos de penetración celular). Preferiblemente dicho péptido se selecciona entre  
30 protaminas e histonas.

En una variante de la invención, el sistema tiene una proporción de componente lipídico que está comprendida entre 0.1% y 20% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.5% y 5%. En otra variante de la invención, cuando se incorpora un lípido líquido a temperatura ambiente en la formulación de las nanopartículas, éste se encuentra en una proporción comprendida entre 0.1 y 5% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.5 y 2%.

Por otro lado, en otra variante de la invención la proporción de tensioactivo catiónico oscila entre 0.05% y 5% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1% y 2%.

En otra variante de la invención, la proporción de tensioactivo no iónico está comprendida preferentemente entre 0.01 y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1 y 3%.

En otra variante de la invención, la proporción de polisacárido se encuentra comprendida entre 0.01 y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, preferentemente entre 0.1 y 3%.

Por su parte, la proporción del péptido de carga positiva, cuando éste se encuentra presente en la formulación, está preferentemente comprendida entre 0.01% y 10% en peso respecto al peso total del sistema incluyendo el agua, más preferentemente entre 0.1% y 3% en peso.

En todos los casos la proporción restante corresponde mayoritariamente a agua purificada donde se encuentran dispersas las nanopartículas. Esto no significa que otros ingredientes no puedan estar presentes tales como moduladores de la viscosidad, conservantes, solubilizantes, antifloculantes, estabilizantes, especialmente estéricos o iónicos o tensoactivos, bien en las nanopartículas, bien en el medio acuoso donde están dispersas o bien adsorbidos sobre ellas.

### **Ácido nucleico**

Las nanopartículas de la presente invención proporcionan sistemas que tienen una elevada capacidad para asociar moléculas biológicamente activas, bien dentro de las nanopartículas o bien adsorbidas sobre ellas. En concreto, el sistema de nanopartículas

de la invención permite asociar hasta el 100% de la molécula activa cuando ésta es un plásmido.

Las nanopartículas de la presente invención incluyen un ácido nucleico como molécula biológicamente activa. En una realización de la invención el ácido nucleico puede ser un ribonucleótido o un desoxiribonucleótido, de cadena simple o de doble cadena y puede ser natural o sintético. De acuerdo con una realización particular, el ácido nucleico se selecciona de un plásmido de ADN, mARN, iARN, microARN, un oligonucleótido o una secuencia antisentido. Preferiblemente, el ácido nucleico es un plásmido de ADN, como por ejemplo pEGFP o pRS1.

El ácido nucleico puede estar incorporado dentro de la estructura de la nanopartícula o puede estar absorbido sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas. De acuerdo con una realización particular, el ácido nucleico queda absorbido sobre la superficie de las nanopartículas una vez formadas éstas.

La proporción de ácido nucleico incorporado en las nanopartículas puede llegar a ser de hasta el 20% en peso con respecto al peso total del sistema, incluyendo el agua. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso del ácido nucleico que vaya a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración. En una realización particular, la proporción del mismo en dicho sistema estaría entre un 0,00001% y un 20% en peso con respecto al peso total del sistema incluido el agua.

## **Enfermedades oculares**

El término “enfermedades oculares” incluye cualquier enfermedad, trastorno o condición que afecta al ojo o a una de las partes o regiones de ojo. De forma general, el ojo incluye el globo ocular y los tejidos y fluidos que lo constituyen, los músculos periorbitales y la porción del nervio óptico que se encuentra dentro o adyacente al globo ocular. El segmento anterior del ojo humano corresponde al tercio frontal del ojo, incluyendo el iris, la córnea, el cuerpo ciliar y la lente. El segmento posterior del ojo incluye el humor vítreo, la retina, la coroides y el nervio óptico.

Los inventores han demostrado mediante ensayos *in vivo* que las nanopartículas de la invención son capaces de transfectar material genético (pEGFP) tanto en células de la retina, especialmente a nivel de las células ganglionales de la retina, como en células del epitelio corneal.

Por tanto, de acuerdo con una realización, la invención se dirige al uso del sistema de nanopartículas descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades del segmento posterior del ojo, como por ejemplo enfermedades degenerativas de la retina.

5 De acuerdo con otra realización, la invención se dirige al uso del sistema de nanopartículas descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades del segmento anterior del ojo, como por ejemplo distrofias corneales.

10 En una realización la invención se dirige al uso del sistema de nanopartículas descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades oculares mediante terapia génica.

El término terapia génica se refiere a la introducción de material genético en un organismo receptor con fines curativos. Se puede emplear terapia génica para obtener el efecto terapéutico deseado a través de distintas estrategias, dependiendo de la enfermedad objetivo. Se puede emplear terapia génica para aportar un gen ausente en el receptor, o bien para complementar o sustituir el defecto en la función de un gen defectuoso introduciendo una copia normal de éste en las células. También es posible emplear terapia génica para obtener el efecto contrario, es decir, inhibir o bloquear el funcionamiento de genes cuya intervención contribuye al desarrollo de la enfermedad.

15 20 Alternativamente, se puede emplear terapia génica no para sustituir o inactivar la función de un gen, sino para introducir la información que permita a la célula sintetizar una proteína con el efecto terapéutico deseado.

De acuerdo con una realización, la invención se dirige al uso del sistema de nanopartículas descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades oculares asociadas a la ausencia o mutación de un gen que codifica una o más proteínas.

25

Según otra realización particular, la invención se dirige al uso del sistema de nanopartículas descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades oculares asociadas a la expresión o sobreexpresión de un gen que codifica una o más proteínas.

30

La retinosquiosis juvenil ligada al cromosoma X es una enfermedad ocular hereditaria en la cual la retina se divide espontáneamente en dos capas y es una de las causas más comunes de degeneración macular juvenil en varones. La manifestación clínica más común es la pérdida progresiva de visión durante las dos primeras décadas de la vida, volviendo a empeorar a partir de los 50 años hasta poder producir ceguera total.

Esta enfermedad se debe a mutaciones en el gen RS1 del cromosoma X. Dicho gen codifica para la proteína retinosquisina que es la responsable de mantener la arquitectura de las capas internas de la retina. Las mutaciones en el gen RS1 en pacientes con retinosquiosis impiden la expresión de esta proteína, cuya ausencia provoca que las capas retinianas se separen y se formen pequeños quistes.

Los inventores han encontrado que las nanopartículas de esta invención son capaces de transfectar el plásmido pCep4-RS1 en células de la retina (ARPE-19) produciendo la síntesis de la proteína retinosquisina. La utilización de las nanopartículas de la invención que presentan un polisacárido y un péptido de carga positiva proporcionó una concentración de retinosquisina muy superior a la observada para sistemas similares pero que carecen del polisacárido y el péptido, lo cual demuestra la mayor capacidad de transfección de las nanopartículas empleadas en la invención.

Así, en una realización particular, la invención se dirige al uso de las nanopartículas descritas previamente para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas al gen RS1, preferiblemente la retinosquiosis juvenil ligada al cromosoma X.

De forma similar, estas nanopartículas pueden emplearse para prevenir, mejorar o tratar otras enfermedades oculares mediante la incorporación del ácido nucleico adecuado para provocar, controlar o impedir la expresión de proteínas asociadas a dicha enfermedad. A modo ilustrativo, a continuación se muestran algunas de las enfermedades oculares más representativas para las que se podrían utilizar las nanopartículas de la presente invención. En la tabla se incluye el efecto necesario para producir la prevención o tratamiento de la enfermedad indicada así como el ácido nucleico que se incorporaría en las nanopartículas de la invención para provocar dicho efecto.

| ENFERMEDAD                                                                                      | EFEECTO BUSCADO                                                                                        | Material genético a administrar                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Glaucoma</b>                                                                                 | Sobreexpresar la proteína recombinante matrix metaloproteinasa (MMP1)                                  | Plásmido que codifique para MMP1                                                     |
|                                                                                                 | Sobreexpresar el regulador de la formación de prostaglandinas COX-2                                    | Plásmido que codifique para COX-2                                                    |
|                                                                                                 | Sobreexpresar factores neurotróficos                                                                   | Plásmido que codifique para dichos factores neurotróficos                            |
|                                                                                                 | Inhibir el crecimiento conjuntival de fibroblastos                                                     | p21 WAF-1/Cip1                                                                       |
| <b>Degeneración macular</b>                                                                     | Inhibición de la neovascularización coroidea (inhibir la expresión de factores angiogénicos)           | siRNA frente a factores angiogénicos (VEGF, vascular endothelial growth factor)      |
|                                                                                                 |                                                                                                        | RNAi anti VEGF                                                                       |
|                                                                                                 |                                                                                                        | siRNA against vascular endothelial growth factor receptor-1 (Sirna-27)               |
|                                                                                                 |                                                                                                        | Plásmido SERPINF1 que codifica para el factor derivado del epitelio pigmentario PEDF |
|                                                                                                 | Inhibición de la neovascularización coroidea (sobreexpresar la expresión de factores antiangiogénicos) | Plásmido que codifique para Platelet-derived growth factor (PDGF)                    |
|                                                                                                 |                                                                                                        | Ciliary neurotrophic factor (CNTF)                                                   |
|                                                                                                 | Inhibir la angiogénesis mediante el bloqueo de factores de crecimiento del endotelio vascular          | Plásmido que codifique para sFLT01 y sFLT02 (novel chimeric VEGF-binding molecules)  |
| <b>Retinopatías (ej. retinopatía diabética, retinopatía isquémica)</b>                          | Inhibición de la neovascularización en la retina (inhibir la expresión de factores angiogénicos)       | RNAi frente a factores angiogénicos (VEGF)                                           |
| <b>Infecciones o inflamaciones de la córnea (ej. Keratitis por herpes simplex)</b>              | Inhibición de la neovascularización en la córnea (inhibir la expresión de factores angiogénicos)       | RNAi frente a factores angiogénicos (VEGF)                                           |
| <b>Amaurosis Congénita de Leber (LCA) y otras enfermedades debidas a mutación del gen RPE65</b> | Expresar el gen RPE65                                                                                  | Plásmido que codifique para hRPE65                                                   |
| <b>Opacidad de la superficie de la córnea</b>                                                   | Expresión del gen dnG1 Cyclin                                                                          | dnG1 Cyclin                                                                          |

|                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Retinitis pigmentosa (mutación de varios genes)</b>                       | Expresión del gen que codifica el factor neurotrófico ciliar (CNTF)                                                                                                                                                                     | CNTF                                                                                   |
| <b>Albinismo</b>                                                             | Expresión del gen OA1                                                                                                                                                                                                                   | Plásmido OA1 que codifica para la proteína GPCR en los melanosomas                     |
| <b>Coroideremia</b>                                                          | Expresión del gen CHM                                                                                                                                                                                                                   | Plásmido CHM que codifica para la proteína REP-1 en la membrana celular                |
| <b>Retinosquiasis juvenil ligada al sexo</b>                                 | Expresión del gen RS1                                                                                                                                                                                                                   | Plásmido RS1 que codifica para la proteína retinosquiasina en los fotorreceptores      |
| <b>Enfermedad de Stargardt</b>                                               | Expresión del gen ABCA4                                                                                                                                                                                                                 | Plásmido ABCA4 que codifica para la proteína RIN en los fotorreceptores                |
| <b>Retinoblastoma (cáncer de retina)</b>                                     | Expresar el factor supresor de tumores p53                                                                                                                                                                                              | Plásmido que codifique la proteína p53                                                 |
|                                                                              | Expresión de genes suicidas                                                                                                                                                                                                             | Gen suicida del virus herpes simplex timidina quinasa/ganciclovir (HSVtk/GCV)          |
| <b>Distrofia granular de la córnea</b>                                       | Bloquear el gen de la proteína Transforming Growth Factor, Beta-Induced (TGFB1)                                                                                                                                                         | siRNA frente al TGFB1                                                                  |
| <b>Distrofia corneal de Fuch</b>                                             | Insertar copias correctas del gen del factor de transcripción 4 (TCF4) que codifica para la familia de proteínas E2-2                                                                                                                   | Plásmido que codifique para TCF4                                                       |
| <b>Distrofia corneal gelatinosa en gotas</b>                                 | Expresar el gen TACSTD-2 (tumor associated calcium signal transducer 2)                                                                                                                                                                 | Plásmido que codifique para TACSTD-2                                                   |
| <b>Rechazo del trasplante de córnea</b>                                      | Inhibir la cascada de procesos inmunológicos que conducen al rechazo del trasplante. Este tipo de tratamiento se puede hacer “in vivo” o “ex vivo” (modificar genéticamente la córnea del donante antes de su inserción en el receptor) | Plásmido que codifique para la IL-4                                                    |
|                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                         | Plásmido que codifique para la IL-10                                                   |
|                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                         | Plásmido que codifique para CTLA4-Ig (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin) |
| <b>Opacidad de la superficie de la córnea asociada a mucopolisacaridosis</b> | Expresión del gen dnG1 Cyclin                                                                                                                                                                                                           | dnG1 Cyclin                                                                            |
|                                                                              | Expresión del gen de la $\beta$ -glucoronidasa                                                                                                                                                                                          | Plásmido que codifique para la $\beta$ -glucoronidasa                                  |

Por lo tanto, de acuerdo con una realización particular, la invención se dirige al uso de un sistema de nanopartículas como se ha descrito previamente para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades

5 oculares seleccionadas de: glaucoma; degeneración macular; retinopatía, incluyendo

retinopatía diabética y retinopatía isquémica; infecciones o inflamaciones de la córnea, como herpes simplex; amaurosis congénita de Leber; opacidad de la superficie de la córnea; retinitis pigmentosa; albinismo; coroideremia; retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X; enfermedad de Stargardt; retinoblastoma; distrofia granular de la córnea; 5 distrofia corneal de Fuch; distrofia corneal gelatinosa en gotas; rechazo del trasplante de córnea; y opacidad de la superficie de la córnea asociada a mucopolisacaridosis.

El término “prevención o tratamiento” en el contexto de la especificación significa la administración de las nanopartículas según la invención para preservar la salud en un paciente que sufre o está en riesgo de sufrir enfermedades oculares. Dichos 10 términos también incluyen la administración de las nanopartículas según la invención para prevenir, mejorar, aliviar o eliminar uno o más síntomas asociados con enfermedades oculares. El término “mejorar” en el contexto de esta invención se entiende que significa cualquier mejora en la situación del paciente tratado, o bien subjetiva (sensación de o en el paciente) o bien objetivamente (parámetros medidos).

15 Las nanopartículas empleadas en la presente invención, pueden estar formando parte de una composición farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida, semi-sólida o líquida (es decir, suspensión o dispersión de la nanopartículas de la invención) para aplicación por vía oral, tópica, parenteral u ocular, o cualquier composición en la forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su 20 administración por vía tópica u ocular.

De acuerdo con una realización particular, las nanopartículas de la invención o la composición farmacéutica que las comprende se administra por vía ocular, preferiblemente mediante inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección subconjuntival o mediante administración tópica en el ojo.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además agentes controladores de pH como por ejemplo agentes tampón, los cuales evitan que el pH de la composición disminuya a valores por debajo de 5, agentes antioxidantes, que inhiben la oxidación del componente lipídico, así como conservantes que evitan cambios estructurales importantes en la formulación. Dependiendo de su función, estos 30 componentes adicionales pueden estar presentes en las fases que componen las nanopartículas o bien en el medio acuoso donde éstas se encuentran dispersas o bien

adsorbidos total o parcialmente sobre ellas. El experto en la materia puede determinar qué componentes adicionales se pueden utilizar y si son necesarios, siendo muchos de ellos de uso común en composiciones farmacéuticas y cosméticas.

En una realización particular, el ácido nucleico no se incorpora dentro de la estructura de la nanopartícula sino que se encuentra adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas. Para ello, dicho ácido nucleico se disuelve en una solución acuosa que, posteriormente, se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente obtenidas.

En otra realización particular, el polisacárido y, opcionalmente, el péptido de carga positiva cuando éste se encuentra presente en la formulación, quedan adsorbidos sobre la superficie de las nanopartículas junto con el ácido nucleico. Para ello, una vez obtenidas las nanopartículas lipídicas, se prepara un complejo que comprende el polisacárido, el ácido nucleico y, opcionalmente el péptido de carga positiva, mediante la puesta en contacto de soluciones acuosas que comprenden, cada una de ellas, los tres componentes mencionados. Una vez obtenido dicho complejo, éste se pone en contacto con las nanopartículas lipídicas previamente obtenidas.

Adicionalmente, se pueden añadir al sistema de nanopartículas otros ingredientes como se han definido previamente tales como moduladores de la viscosidad, conservantes, solubilizantes, antifloculantes, estabilizantes, especialmente estéricos o iónicos o tensoactivos. Estos componentes serán adicionados a la fase lipofílica o hidrofílica dependiendo de la naturaleza de los mismos.

A continuación, se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención, no obstante, no se deben interpretar como limitativos del objeto de la invención tal como está definido en las reivindicaciones.

### Ejemplos

*Ejemplo 1. Preparación de nanopartículas sin polisacárido ni péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 1).*

Se preparó una disolución de precirol al 5% en diclorometano (2 mL). Por otro lado, se preparó una disolución acuosa (10 mL) de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se

añadió la fase acuosa sobre la fase oleosa, sometiendo la mezcla a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se procedió a la evaporación del solvente orgánico, manteniendo la emulsión durante al menos 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante al menos 5 minutos. De este modo, el

5 lípido precipitó, obteniéndose una suspensión de nanopartículas. Tras enfriar a temperatura entre 4 y 8 °C, se filtraron por centrifugación y se resuspendieron en agua purificada.

Para elaborar los complejos con el material genético se preparó una disolución del plásmido (pCMS-EGFP) de 1 µg/µL en agua destilada. Posteriormente, se puso en

10 contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 2. Preparación de nanopartículas con polisacárido y sin péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 2).*

15 Nanopartículas lipídicas:

Se preparó una disolución de precirol al 5% en diclorometano. Por otro lado, se preparó una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se añadió la fase acuosa sobre la fase oleosa en una relación 1:5 y se sometió la mezcla a sonicación (Branson Sonifier 250, Danbury) durante 30 segundos at 50W. A continuación se procedió a la

20 evaporación del solvente orgánico, manteniendo la emulsión durante 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante 15 minutos. Tras enfriar en nevera (4-8 °C) durante 15 minutos, las nanopartículas obtenidas se lavaron centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

25 Complejos dextrano:pCMS-EGFP:

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de dextrano de peso molecular de aproximadamente 3200 (suministrado por Sigma) (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las dos disoluciones con

30 una proporción dextrano:pCMS-EGFP de 5:1 y se matuvieron en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5 *Ejemplo 3. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 3).*

Nanopartículas lipídicas:

Se preparó una disolución de precirol al 5% en diclorometano. Por otro lado, se preparó una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se añadió la fase acuosa  
10 sobre la fase oleosa en una relación 1:5 y se sometió la mezcla a sonicación (Branson Sonifier 250, Danbury) durante 30 segundos a 50W. A continuación se procedió a la evaporación del solvente orgánico, manteniendo la emulsión durante 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante 15 minutos. Tras enfriar en nevera (4-8 °C) durante 15 minutos, las nanopartículas obtenidas se lavaron  
15 centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Complejos dextrano:protamina:pCMS-EGFP:

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante  
20 disolución de dextrano de peso molecular de aproximadamente 3200 (suministrado por Sigma) (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción dextrano:protamina:pCMS-EGFP de 1:2:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

25 A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

30 *Ejemplo 4. Preparación de nanopartículas sin polisacárido ni péptido mediante la técnica de homogenización a alta presión (Formulación 4).*

Se fundieron 100 mg de precirol calentando a 70 °C. Por otro lado, se preparó una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se preparó una pre-emulsión añadiendo la fase acuosa (10 mL) sobre el lípido fundido, sometiendo la mezcla a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se sometió la  
5 mezcla a homogenización a alta presión en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al menos 1 ciclo. Tras enfriar en nevera (4-8 °C) durante 15 minutos, las nanopartículas obtenidas se lavaron centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

*Ejemplo 5. Preparación de nanopartículas con polisacárido y sin péptido mediante la  
10 técnica de homogenización a alta presión (Formulación 5).*

Nanopartículas lipídicas:

Se fundieron 100 mg de precirol calentando a 70 °C. Por otro lado, se preparó una disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se preparó una pre-emulsión añadiendo la fase acuosa (10mL) sobre el lípido fundido, sometiendo la  
15 mezcla a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se sometió la mezcla a homogenización a alta presión en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al menos 1 ciclo. Tras enfriar en nevera (4-8 °C) durante 15 minutos, las nanopartículas obtenidas se lavaron centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando filtros Amicon® Ultra (Millipore).

## 20 Complejos dextrano:pCMS-EGFP

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de dextrano de aproximadamente 3200 (suministrado por Sigma) (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las dos disoluciones con una proporción  
25 dextrano:pCMS-EGFP: de 5:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en  
30 agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 6. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de homogenización a alta presión (Formulación 6).*

#### Nanopartículas lipídicas

Se fundieron 100 mg de precirol calentando a 70 °C. Por otro lado, se preparó una  
5 disolución acuosa de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se preparó una preemulsión  
añadiendo la fase acuosa (10mL) sobre el lípido fundido, sometiendo la mezcla a una  
fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se sometió la mezcla a  
homogenización a alta presión en caliente con una presión de al menos 30 psi y con al  
menos 1 ciclo. Tras enfriar en nevera (4-8 °C) durante 15 minutos, las nanopartículas  
10 obtenidas se lavaron centrifugando 3 veces a 3000 rpm durante 20 minutos utilizando  
filtros Amicon® Ultra (Millipore).

#### Complejos dextrano:protamina:pCMS-EGFP

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1  
µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante  
15 disolución de dextrano de aproximadamente 3200 (suministrado por Sigma) (1 µg/µL)  
en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución  
de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones  
con una proporción dextrano:protamina:pCMS-EGFP de 1:2:1 y se mantuvo en  
agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

20 A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución  
que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1  
(expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en  
agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 7. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la  
25 técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 7).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1  
µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante  
disolución de dextrano de peso molecular de aproximadamente 8000 (suministrado por  
Sigma) (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa  
30 mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto

las tres disoluciones con una proporción dextrano:protamina:pCMS-EGFP de 1:3:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 8. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 8).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de dextrano de peso molecular de aproximadamente 1000 (suministrado por Sigma) (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción dextrano:protamina:pCMS-EGFP de 3:1:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 9. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 9).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de carragenano (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción carragenano:protamina:pCMS-EGFP de 0.5:2:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 10. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 10).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de ácido colomínico (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción ácido colomínico:protamina:pCMS-EGFP de 0.5:2:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 11. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 11).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de ácido hialurónico (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción ácido hialurónico:protamina:pCMS-EGFP de 0.1:2:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado

con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 12. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 12).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de heparina (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción heparina:protamina:pCMS-EGFP de 0.1:2:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 13. Preparación de nanopartículas con polisacárido y sin péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 13).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de ácido hialurónico (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las dos disoluciones con una proporción ácido hialurónico:pCMS-EGFP de 0.1:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 14. Preparación de nanopartículas con polisacárido y sin péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 14).*

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCMS-EGFP (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante  
5 disolución de heparina de bajo peso molecular (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en agua destilada. Se pusieron en contacto las dos disoluciones con una proporción heparina de bajo peso molecular:pCMS-EGFP de 0.1:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas  
10 según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 5:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 15. Preparación de nanopartículas sin polisacárido ni péptido mediante la  
15 técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 15).*

Se preparó una disolución de precirol al 5% en diclorometano (2 mL). Por otro lado, se preparó una disolución acuosa (10 mL) de DOTAP al 0,4% y Tween 80 al 0,1%. Se añadió la fase acuosa sobre la fase oleosa, sometiendo la mezcla a una fuerte agitación hasta obtener una emulsión. A continuación se procedió a la evaporación del solvente  
20 orgánico, manteniendo la emulsión durante al menos 5 minutos en agitación mecánica, sometiéndola posteriormente a vacío durante al menos 5 minutos. De este modo, el lípido precipitó, obteniéndose una suspensión de nanopartículas. Tras enfriar a temperatura entre 4 y 8 °C, se filtraron por centrifugación y se resuspendieron en agua purificada.

25 Para elaborar los complejos con el material genético se preparó una disolución del plásmido (pCep4-RS1) de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en agua destilada. Posteriormente, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas con la disolución que contiene el material genético, en una proporción 6:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

30 *Ejemplo 16. Preparación de nanopartículas con polisacárido y con péptido mediante la técnica de emulsificación/evaporación del solvente (Formulación 16).*

Complejo dextrano:protamina:pCep4-RS1:

Se preparó una solución acuosa mediante disolución del plásmido pCep4-RS1 (1 µg/µL) en agua destilada. Por otra parte, se preparó otra solución acuosa mediante disolución de dextrano (1 µg/µL) en agua destilada. Adicionalmente, se preparó otra  
5 solución acuosa mediante disolución de protamina (1 µg/µL) en agua destilada. Se pusieron en contacto las tres disoluciones con una proporción dextrano:protamina:pCep4-RS1 de 1:2:1 y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se puso en contacto la suspensión de nanopartículas lipídicas obtenidas  
10 según se detalla en el ejemplo 3, con la disolución que contiene el complejo formado con el material genético, en una proporción 6:1 (expresado como la relación peso/peso entre el DOTAP y el ADN) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

*Ejemplo 17. Capacidad de protección del ADN frente a DNAsa I y liberación inducida  
15 con SDS.*

Para conocer la capacidad de protección de las formulaciones sobre el ADN, se utilizó la enzima desoxirribonucleasa I (DNsa I) que es capaz de hidrolizar las moléculas de ADN. Las formulaciones 1-6 se pusieron en contacto con DNAsa durante 30 minutos a 37 °C. Se utilizó 1 U de DNAsa por cada 2,5 µg de ADN. Pasados los 30 minutos, se  
20 añadió lauril sulfato sódico (SDS) hasta una concentración final del 1%, para detener la acción de la enzima y liberar el ADN de las muestras. Las muestras se analizan posteriormente en un gel de azarosa como se ha definido previamente en los procedimientos comunes.

En las figuras 1 a 4 se recogen los geles de electroforesis que muestran la capacidad de  
25 condensación del ADN, la capacidad de protección frente a DNAsas y la liberación inducida por SDS. Se puede comprobar que tanto las nanopartículas que contienen el polisacárido, como las que contienen la combinación polisacárido-péptido, son capaces de condensar el ADN, de protegerlo frente a la DNAsa y además, el ADN es capaz de liberarse del complejo.

*Ejemplo 18. Ensayos in vitro de capacidad de transfección celular de las formulaciones  
30 1 a 14.*

La evaluación in vitro de las formulaciones 1-14 se llevó a cabo en la línea celular ARPE-19 (human retinal pigment epithelial cells). Estas células se mantuvieron en cultivo en medio Dulbecco's MEM: Ham's Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mix (DMEM: F-12) con suero de bovino fetal al 10%, antibiótico Normocin al 0.2% y penicilina. Los cultivos celulares se mantienen a 37 °C en atmósfera de aire con un 5% de CO<sub>2</sub>, realizando cambios del medio cada 2 ó 3 días. Los estudios de transfección se realizaron en placas de 24 pocillos con densidades de 30.000 células por pocillo y se dejaron incubar hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia. Entonces se retiró parte del medio, dejando el volumen necesario para cubrir todo el pocillo, añadiendo a continuación la formulación a estudiar. Se dejaron incubar durante 4 horas y entonces se añadió más volumen de medio. La cantidad de vectores que se añadió a cada pocillo fue la equivalente a 2,5 µg de ADN.

Se evaluó la transfección y la viabilidad celular mediante citometría de flujo (FACSCalibur™, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA). La fluorescencia debido a la EGFP se midió a 525 nm (FL1). Para cada muestra, se utilizaron 10.000 eventos. La viabilidad celular se analizó utilizando el kit BD Via-Probe™. Este kit contiene el reactivo 7-amino-actinomicina (7-AAD) utilizado para la exclusión de células no viables, que produce fluorescencia en contacto con las células muertas. La fluorescencia debido al 7-AAD, correspondiente a las células no viables, se midió a 650 nm (FL3), tomándose 10.000 eventos por muestra. Se utilizaron como control células sometidas a las condiciones de cultivo habituales. Con todas las formulaciones se obtuvieron viabilidades superiores al 80%, un valor similar al obtenido con los controles (células sin transfectar); esto indica una ausencia aparente de toxicidad. Por otro lado, la inclusión del polisacárido (formulación 2) y la combinación de péptido + polisacárido (formulación 3), incrementa la viabilidad con respecto a la formulación que no incluye esos componentes (formulación 1). Las diferencias son más notables para la formulación 3.

Los estudios de transfección se llevaron a cabo en células ARPE-19. Se midió, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células transfectadas (% células EGFP positivas) y la viabilidad celular. La figuras 5 y 6 muestran los resultados correspondientes a los estudios de transfección y viabilidad celular en las células ARPE-19 para las formulaciones 1 a 3, mientras que la figura 7 muestra los resultados correspondientes a

los estudios de transfección y viabilidad celular en las células ARPE-19 para las formulaciones 7 a 14. Se hizo un estudio con DOTAP liposomal como control.

Como puede comprobarse, la incorporación en la formulación de un polisacárido incrementa la transfección con respecto al grupo control (nanopartículas sin polisacárido ni péptido). No obstante, la incorporación en la formulación de un polisacárido y un péptido permite aumentar de forma sinérgica los niveles de transfección cuando se compara con un sistema de nanopartículas que incluye únicamente el mencionado polisacárido, así como mejorar la viabilidad celular.

*Ejemplo 19. Ensayo in vitro de la capacidad de transfección celular de las formulaciones 15 y 16 en la línea celular ARPE-19 (human retinal pigment epithelial cells)*

La evaluación *in vitro* de las formulaciones 15 y 16 se llevó a cabo en la línea celular ARPE-19 (human retinal pigment epithelial cells). Estas células se mantuvieron en cultivo en medio Dulbecco's MEM: Ham's Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mix (DMEM: F-12) con suero de bovino fetal al 10%, antibiótico Normocin al 0.2% y penicilina. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de aire con un 5% de CO<sub>2</sub>, realizando cambios del medio cada 2 ó 3 días. Los estudios de transfección se realizaron en placas de 24 pocillos con densidades de 30.000 células por pocillo y se dejaron incubar hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia. Entonces se retiró parte del medio, dejando el volumen necesario para cubrir todo el pocillo, añadiendo a continuación la formulación a estudiar. Se dejaron incubar durante 4 horas y entonces se añadió más volumen de medio. La cantidad de vectores que se añadió a cada pocillo fue la equivalente a 2,5 µg de ADN.

La expresión *in vitro* de la retinosquisina codificada por el gen RS1 en las células ARPE-19 se detectó mediante inmunohistoquímica (figura 8).

Además, se cuantificó la retinosquisina, que fue extraída mediante galactosa debido a la interacción del dominio discoidin de la retinosquisina con este sacárido (figura 9). La proteína extraída se cuantificó con la técnica Bradford. Como puede comprobarse, la incorporación en la formulación de un polisacárido y un péptido incrementó la transfección con respecto al grupo control.

*Ejemplo 20. Ensayo in vivo de capacidad de transfección de las nanoparículas*

Para realizar la administración *in vivo* de las nanopartículas a nivel de la retina y/o de la cornea se utilizaron ratas albinas Wistar adultas. Antes de realizar la administración los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (70 mg/kg, Ketolar<sup>®</sup>, Pfizer, NY, USA) y Xilacina (10 mg/kg, Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Alemania).

- 5 A continuación se les indujo en ambos ojos una midriasis pupilar instilándoles una gota de tropicamida al 1% (Colicursi tropicamida 1%<sup>®</sup>, Alcon-Cusi, Barcelona, España) y posteriormente fueron anestesiados tópicamente con una gota de Colicursi Anestésico Doble<sup>®</sup> (Alcon-Cusi, Barcelona).

#### *Administración de nanopartículas lipídicas en la retina*

- 10 Para estudiar la mejor vía de administración para que las nanopartículas lleguen a la retina se utilizaron tanto inyecciones subretinianas como inyecciones intravítreas. En ambos casos los animales fueron inyectados en el ojo izquierdo con 3 µl de una suspensión de nanopartículas lipídicas según las formulaciones 1 y 3 (0,033 µgr pCMS-EGFP µg/µL). Para ello se utilizó una jeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno NV, USA) con una aguja con diámetro interno de 130 mm (calibre 26G). El ojo derecho se usó como control. Una vez realizadas las inyecciones se comprobó la correcta vascularización de la retina mediante fundoscopia directa.

- A las 96 horas de la administración, los animales fueron eutanasiados (previa anestesia con isoflurano). Posteriormente se extrajeron ambos ojos y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante toda la noche. Al día siguiente, las retinas fueron aisladas y tras varios lavados en agua destilada se montaron sobre portas (preparación “wholemout”) con ayuda de un medio de montaje específico para fluorescencia (VectaShield, Vector Laboratories). Finalmente las retinas fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus AX70).

#### *Administración tópica de nanopartículas lipídicas en la cornea*

- Para los estudios de transfección corneal se instilaron 3 gotas de la solución de nanopartículas lipídicas en el ojo izquierdo de ratas albinas Wistar. Los animales fueron sacrificados a las 72 horas, se enuclearon los ojos y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante toda la noche. Al día siguiente, las corneas fueron aisladas y tras varios lavados en agua destilada se montaron sobre portas (preparación “wholemout”) con ayuda de un medio de montaje específico para fluorescencia (VectaShield, Vector

Laboratories). Finalmente las preparaciones fueron observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus AX70).

Los resultados obtenidos muestran que la administración de nanopartículas lípicas con el plásmido pCMS-EGFP es capaz de inducir la trasfección efectiva de pCMS-EGFP en  
5 diferentes poblaciones celulares de la retina, especialmente a nivel de las células ganglionares de la retina (Figura 10). En este sentido, la inyección intravítrea es más eficiente para la incorporación de nanopartículas a las células de la retina. Por otro lado, la administración tópica de nanopartículas lipídicas con el plásmido pCMS-EGFP también fue capaz de inducir trasfección efectiva de GFP en las células del epitelio  
10 corneal (Figura 11).

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un sistema de nanopartículas, donde las nanopartículas comprenden:
  - al menos un ácido nucleico;
  - al menos un lípido sólido a temperatura ambiente;
  - 5      - al menos un tensioactivo catiónico;
  - al menos un tensioactivo no iónico; y
  - al menos un polisacárido;para preparar un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades oculares.
- 10      2. Uso según la reivindicación 1, donde las nanopartículas comprenden además al menos un péptido de carga neta positiva.
- 15      3. Uso según la reivindicación 2, donde el péptido de carga neta positiva se selecciona entre péptidos de señalización nuclear, péptidos de señalización mitocondrial, péptidos de reconocimiento de la superficie celular que comprenden la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico y péptidos de penetración celular.
- 20      4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el lípido sólido a temperatura ambiente se selecciona entre monoglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos y mezclas de los mismos.
- 25      5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tensioactivo catiónico se selecciona entre sales de amonio primario, secundario, terciario y cuaternario, de estructura lineal o cíclica, mezclas de las mismas y derivados de las mismas.
- 30      6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tensioactivo no iónico se selecciona entre polisorbatos, copolímeros de polietilenglicol, copolímeros de polipropilén glicol y mezclas de los mismos.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polisacárido se selecciona entre quitosanos, dextranos, ácido hialurónico, carragenano, condroitina,

keratano, ácido colomínico, xantano, ciclodextrinas, sales, derivados y mezclas de los mismos.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ácido nucleico se selecciona entre un plásmido de ADN, mRNA, iARN, microRNA, un oligonucleótido, una secuencia antisentido y mezclas de los mismos.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad ocular es una enfermedad del segmento posterior del ojo.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad ocular es una enfermedad del segmento anterior del ojo.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad ocular se debe a la ausencia o mutación de un gen.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad ocular se debe a la expresión o sobreexpresión de un gen.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad ocular se selecciona entre glaucoma; degeneración macular; retinopatía, incluyendo retinopatía diabética y retinopatía isquémica; infecciones o inflamaciones de la córnea, como herpes simplex; amaurosis congénita de Leber; opacidad de la superficie de la córnea; retinitis pigmentosa; albinismo; coroideremia; retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X; enfermedad de Stargardt; retinoblastoma; distrofia granular de la córnea; distrofia corneal de Fuch; distrofia corneal gelatinosa en gotas; rechazo del trasplante de córnea; y opacidad de la superficie de la córnea asociada a mucopolisacaridosis.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas se administran mediante inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección subconjuntival o mediante administración tópica en el ojo.

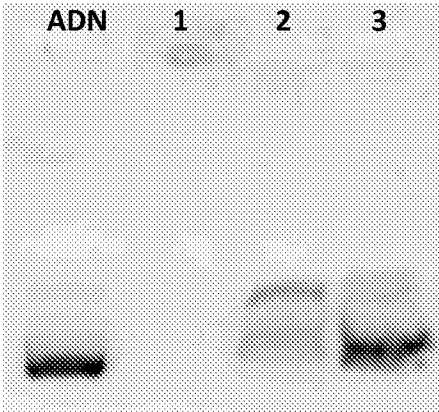


Figura 1

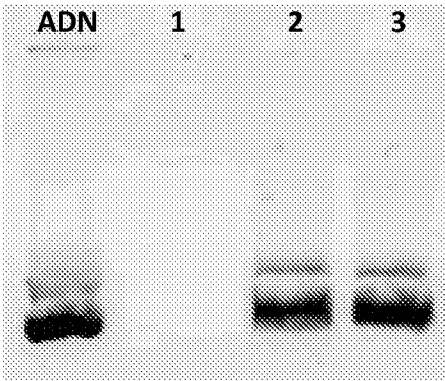


Figura 2

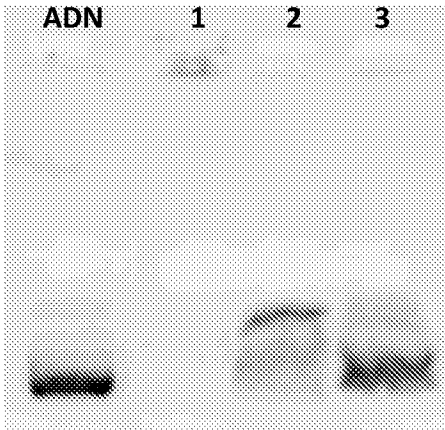


Figura 3

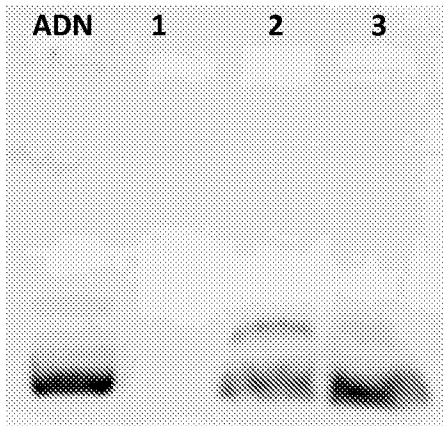


Figura 4

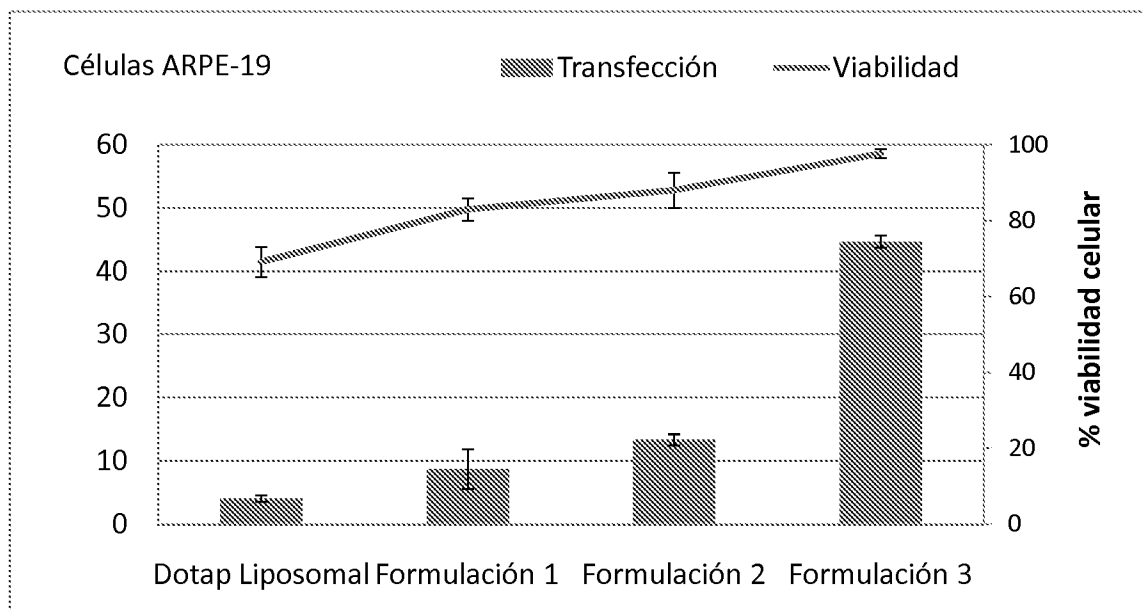


Figura 5

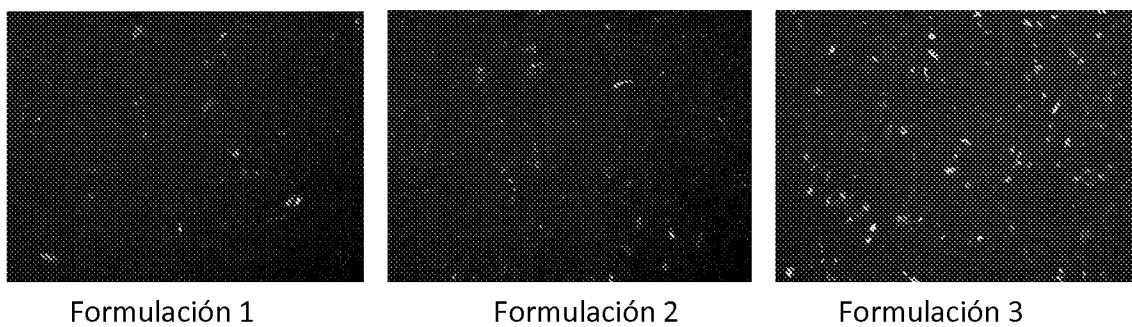


Figura 6

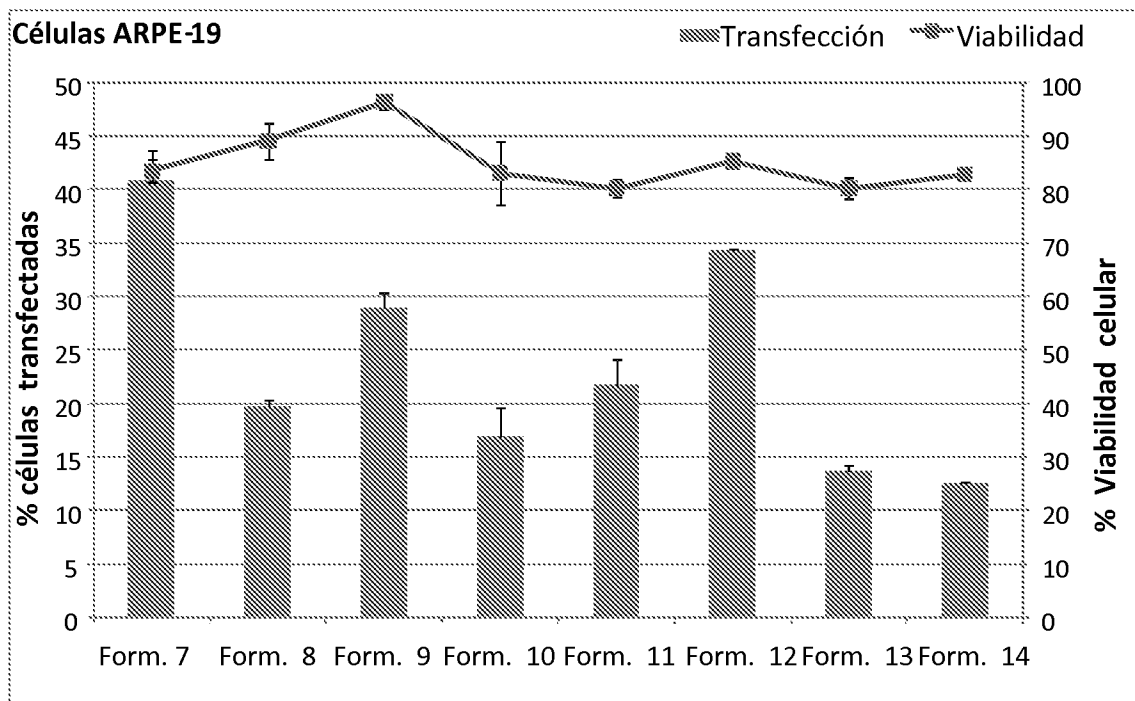


Figura 7

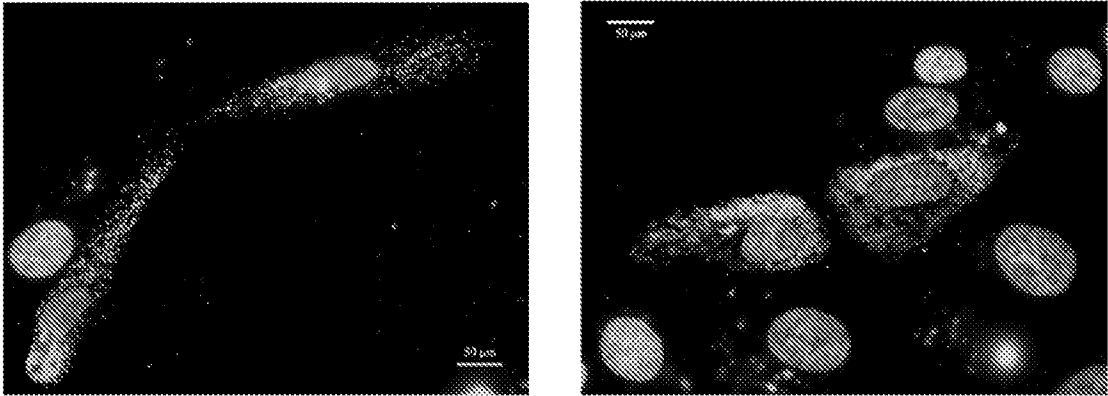


Figura 8

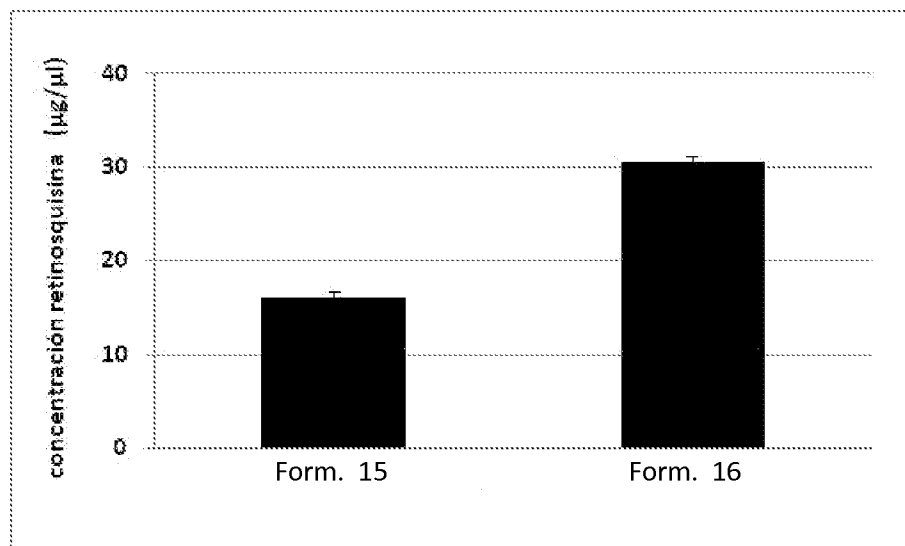


Figura 9

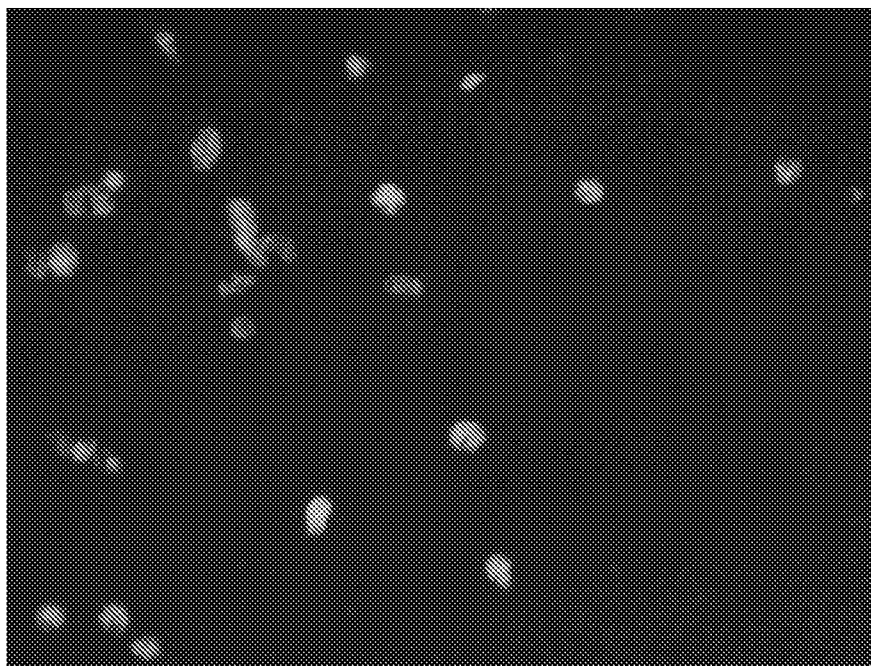


Figura 10

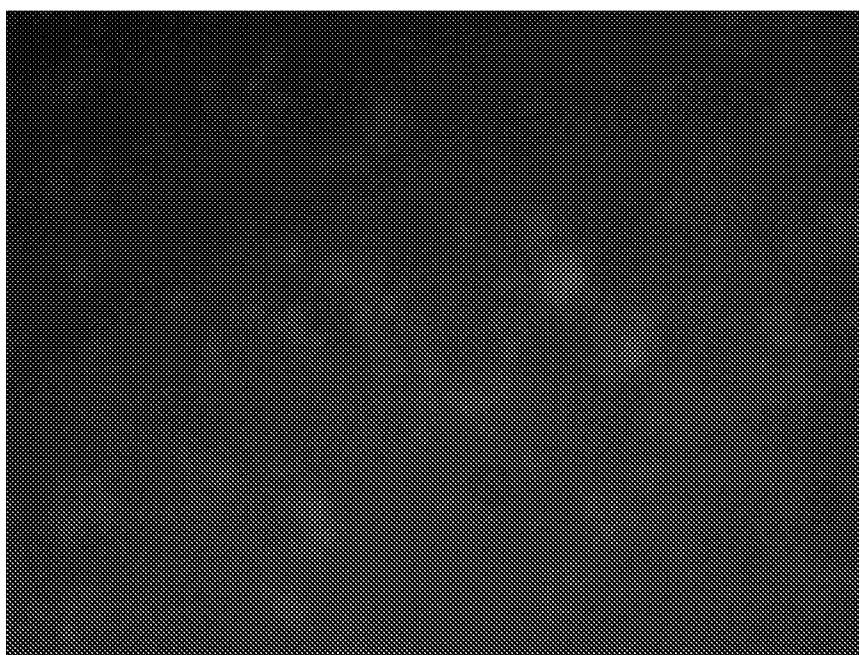


Figura 11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2011/070883

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI,

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X       | ES 2 351 756 B1 (UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO)<br>10.02.2011, the whole document.                                                                                                                                                                                                                           | 1-14                  |
| A         | WO 2005/120469 A1 (M <sup>a</sup> ROSA GASCO) 22.12.2005,<br>the whole document.                                                                                                                                                                                                                          | 1-14                  |
| A         | WO 00/06120 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE<br>AND TECHNOLOGY) 10.02.2000, the whole document.                                                                                                                                                                                                             | 1-14                  |
| A         | DEL POZO-RODRIGUEZ et al. "Solid<br>lipid nanoparticles for retinal gene therapy:<br>transfection and intracellular trafficking<br>in RPE cells" International Journal of Pharmaceutics<br>(22.04.2008) Vol. 360, N°. 1-2, pages 177<br>- 183; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.023;<br>the whole document. | 1-14                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search  
27/03/2012

Date of mailing of the international search report  
(16/04/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
M. García Coca

Telephone No. 91 3493411

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2011/070883

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                   |                       |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
| A                                                     | MARUYAMA et al. "Novel receptor-mediated gene delivery system comprising plasmid/protamine/sugar-containing polyanion ternary complex" Biomaterials (21.11.2003) Vol. 25, N°. 16, pages 3267 - 3273; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.004; the whole document. | 1-14                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070883

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| ES2351756 AB                                  | 18.02.2011          | WO2011015701 A             | 10.02.2011          |
| -----                                         | -----               | -----                      | -----               |
| WO2005120469 A                                | 22.12.2005          | ITMI20041151 A             | 09.09.2004          |
|                                               |                     | EP1761251 A                | 14.03.2007          |
|                                               |                     | EP20050753963              | 08.06.2005          |
|                                               |                     | US2008206341 A             | 28.08.2008          |
| -----                                         | -----               | -----                      | -----               |
| WO0006120 A                                   | 10.02.2000          | AU5068999 A                | 21.02.2000          |
|                                               |                     | KR20000012106 A            | 25.02.2000          |
|                                               |                     | EP1100464 A                | 23.05.2001          |
|                                               |                     | EP19990935145              | 30.07.1999          |
|                                               |                     | KR20020033665 A            | 07.05.2002          |
|                                               |                     | JP2002521423 A             | 16.07.2002          |
| -----                                         | -----               | -----                      | -----               |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070883

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K9/51* (2006.01)

*A61K48/00* (2006.01)

*A61P27/02* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2011/070883

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI,

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                 | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| P,X        | ES 2 351 756 B1 (UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO) 10.02.2011, todo el documento.                                                                                                                                                                                                              | 1-14                                   |
| A          | WO 2005/120469 A1 (Mª ROSA GASCO) 22.12.2005, todo el documento.                                                                                                                                                                                                                         | 1-14                                   |
| A          | WO 00/06120 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 10.02.2000, todo el documento.                                                                                                                                                                                                | 1-14                                   |
| A          | DEL POZO-RODRIGUEZ et al. "Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: transfection and intracellular trafficking in RPE cells" International Journal of Pharmaceutics (22.04.2008) Vol. 360, Nº. 1-2, páginas 177 - 183; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.023; todo el documento. | 1-14                                   |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
27/03/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**16 de abril de 2012 (16/04/2012)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. García Coca  
Nº de teléfono 91 3493411

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070883

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                        |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                           | Relevante para las reivindicaciones nº |
| A                                                    | MARUYAMA et al. "Novel receptor-mediated gene delivery system comprising plasmid/protamine/sugar-containing polyanion ternary complex" Biomaterials (21.11.2003) Vol. 25, Nº. 16, páginas 3267 - 3273; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.004; todo el documento. | 1-14                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070883

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes | Fecha de<br>Publicación |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| ES2351756 AB                                             | 18.02.2011              | WO2011015701 A                          | 10.02.2011              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |
| WO2005120469 A                                           | 22.12.2005              | ITMI20041151 A                          | 09.09.2004              |
|                                                          |                         | EP1761251 A                             | 14.03.2007              |
|                                                          |                         | EP20050753963                           | 08.06.2005              |
|                                                          |                         | US2008206341 A                          | 28.08.2008              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |
| WO0006120 A                                              | 10.02.2000              | AU5068999 A                             | 21.02.2000              |
|                                                          |                         | KR20000012106 A                         | 25.02.2000              |
|                                                          |                         | EP1100464 A                             | 23.05.2001              |
|                                                          |                         | EP19990935145                           | 30.07.1999              |
|                                                          |                         | KR20020033665 A                         | 07.05.2002              |
|                                                          |                         | JP2002521423 A                          | 16.07.2002              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |

## CLASIFICACIONES DE INVENCION

*A61K9/51* (2006.01)

*A61K48/00* (2006.01)

*A61P27/02* (2006.01)