



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 097**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02767270 .8**

96 Fecha de presentación : **29.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1526840**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2005**

54

Título: **Nanopartículas para la administración de ADN a un órgano diana.**

73 Titular/es: **NanoDel Technologies GmbH**  
**Leipziger Strasse 44**  
**39120 Magdeburg, DE**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2009**

72

Inventor/es: **Sabel, Bernhard A.;**  
**Walz, Christian y**  
**Ringe, Kerstin**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 314 097 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas para la administración de ADN a un órgano diana.

5 La presente invención se refiere al uso de nanopartículas para la transfección de ADN en células eucariotas. La presente invención también se refiere a la administración de ADN a un órgano diana en el cuerpo humano o animal. En particular, la presente invención se refiere al uso de nanopartículas para la administración de ADN relacionado con el tratamiento del cáncer a un órgano diana afectado por un tumor en el cuerpo humano o animal como, por ejemplo, el cerebro en el caso de tumores cerebrales. La presente invención también se refiere al uso de nanopartículas para  
10 la fabricación de un medicamento contra tumores en un órgano diana en el cuerpo humano o animal. La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento centrado en la diana del cuerpo humano o animal mediante la administración de ADN adecuado para prevenir y/o tratar terapéuticamente cánceres.

15 Las nanopartículas tal como se utilizan en la presente invención son partículas fabricadas de un polímero sintético o natural y que tienen un diámetro en el intervalo de 1 a 1000 nm. Se podía observar en la técnica anterior que las nanopartículas son adecuadas para unir (por ejemplo, adsorber, absorber, comprender) sustancias naturales o sintéticas, tales como fármacos, medicamentos, agentes de diagnóstico, oligonucleótidos antisentido, proteínas, plásmidos, etc.) y transportar dichas sustancias a órganos diana en el cuerpo humano o animal, como el cerebro, hígado, riñones, etc. (WO 95/22963 y WO 98/56361). Particularmente, se podía demostrar que las nanopartículas se pueden utilizar para  
20 transportar medicamentos para el tratamiento de cánceres a un órgano diana, incluyendo el cerebro. En otras palabras: los medicamentos que en ningún caso pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica (bbb) son capaces de hacerlo mediante su unión a nanopartículas adecuadas (WO 00/74658).

25 En particular, se observó que las nanopartículas fabricadas mediante la polimerización de un monómero seleccionado del grupo que consiste en metilmetacrilatos, alquilocianoacrilatos, hidroxietilmetacrilatos, ácido metacrílico, dimetacrilato de etilenglicol, acrilamida, N,N'-bismetilen acrilamida, metacrilato de 2-dimetilaminoetilo, N,N-L-lisindiitertefalato, ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliláctico-ácido poliglicólico, polianhidros, poliortoésteres, gelatina, albúmina, macromoléculas o carbohidratos desolvatados, poliestireno, poli(vinilpiridina), poliacroleína y poliglutaraldehído en presencia de un estabilizante que permiten el paso de la barrera hematoencefálica, estando dichas  
30 partículas opcionalmente recubiertas por una sustancia, tal como Polisorbato<sup>®</sup> 80 (Monooleato de Polioxietileno (20) sorbitano = Tween<sup>®</sup> 80) o similar, se pueden utilizar para transportar fármacos para el tratamiento del cáncer, tales como doxorubicina, a un órgano diana específico, tal como cerebro (mediante el paso a través de la barrera hematoencefálica), mientras que otros órganos no están afectados por dicho fármaco.

35 La transfección de genes o ADN, respectivamente, en células *in vivo* con micropartículas se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6.248.720. Las micropartículas que consisten en polímeros bioadhesivos, que se definen como polímeros que tiene la capacidad de unirse al epitelio mucoso bajo condiciones fisiológicas normales, se administran oralmente o por inhalación y contienen genes bajo el control de un promotor. A continuación, el gen liberado se puede utilizar para métodos terapéuticos de genes a realizarse en la célula. Esta estrategia, sin embargo, no se podía  
40 transformar en un método útil en la práctica para la transfección de genes en todo tipo de células, particularmente debido al hecho de que el gen o ADN, respectivamente, transportado por la micropartícula no podía pasar a través de las barreras fisiológicas, tales como la barrera hematoencefálica. Según esto, la patente de Estados Unidos anterior da a conocer solamente una terapia génica inespecífica para el tratamiento de células epiteliales, células linfáticas asociadas a los intestinos, células de bazo o células de hígado.

45 En una base mundial, los tumores del cerebro pertenecen a los tumores más extendido observados en gente joven. En los Estados Unidos, aparecen 180.000 nuevos casos de diferentes tumores cerebrales, en particular tumores del grupo heterogéneo de gliomas malignos, que cubre astrocitomas anaplásicos, glioblastomas y, especialmente, el glioblastoma multiforme altamente maligno. El hecho de que las preparaciones para suprimir farmacológicamente la formación de reincidentes aún no esté disponible, da lugar a una mortalidad elevada de gente joven afectada por dichos  
50 tumores. Por lo tanto, es muy deseado hallar métodos de tratamiento satisfactorios de dichos tumores con el fin de obtener una mejora en la tasa de tratamiento satisfactorio.

55 Los gliomas malignos y los glioblastomas en humanos, se tratan, en la mayoría de casos, mediante la extracción quirúrgica del tejido tumoral, seguido de quimioterapia y/o radiación. En muchos de los casos, el tratamiento por quimioterapia no es satisfactorio, ya que existen dos barreras que superar para agentes citostáticos en la etapa de tratamiento antes de tener su efecto completo, es decir, la barrera hematoencefálica y una quimiorresistencia intrínseca que aparece frecuentemente de la barrera hematoencefálica y del tumor. Por lo tanto, es esencial en la evolución del tratamiento farmacológico de tumores cerebrales del tipo anterior desarrollar estrategias para el transporte de dichos  
60 agentes quimioterapéuticos a través de la barrera hematoencefálica *in vivo*. Entre los métodos conocidos se encuentran métodos de apertura de barrera (tratamiento invasivo) para abrir la barrera hematoencefálica, métodos de modificación del agente farmacológico, mediante el cual la modificación permite que el agente atraviese la barrera hematoencefálica y métodos de utilización de péptidos quiméricos para dirigir moléculas pequeñas farmacológicamente eficaces a sitios específicos en el cerebro.

65 En las publicaciones WO referidas anteriormente, entre otras, se realizaron propuestas de sistemas de liberación de fármacos que permiten el reconocimiento de fármacos, incluyendo fármacos anticancerígenos, a órganos específicos en el cuerpo humano o animal y, en particular, al cerebro, mediante lo cual los fármacos que se sabe que no

pasan la barrera hematoencefálica podían ser transportados al cerebro con el fin de tratar los cánceres de cerebro. Particularmente, después de recubrir nanopartículas cargadas con un fármaco analgésico (por ejemplo, el hexapéptido encefalina, dalargina) o con un fármaco anticáncer (por ejemplo, doxorubicina) con Polisorbato® 80 y administrar dichas composiciones farmacológicas que contienen nanopartículas en un vehículo adecuado al cuerpo humano o animal, se podía determinar un aumento de la concentración de dichos fármacos en el cerebro, en comparación con el caso de una administración de dichos fármacos solos, pero sin el sistema de liberación de fármacos.

La mayoría de estrategias para liberar genes a células utilizan virus o vectores virales en los que se insertan genes o plásmidos. A continuación, las células o tejido del cuerpo se exponen al virus o vector viral que contiene el gen o plásmido. A continuación, el virus infecta o entra en la célula y libera el gen o plásmido en el interior de la célula. De manera ideal, a continuación el gen se transcribe en la célula y los productos de transcripción resultantes son biológicamente activos. Sin embargo, la estrategia que utiliza virus o vectores virales tiene numerosos problemas, siendo uno de ellos que los vectores virales pueden producir efectos secundarios tóxicos. Además, provocan una respuesta inmune que es indeseable. Además, un gen que se expresa de manera continua se puede “desconectar” mediante la respuesta celular y, de este modo, se vuelve inactivo en un proceso de tolerancia. Finalmente, los vectores virales, debido a su distribución inespecífica en el cuerpo, no permiten un reconocimiento de los genes/ADN en sitios específicos del cuerpo, particularmente sin reconocimiento en áreas protegidas por barreras naturales, tales como la barrera hematoencefálica.

Sabel B.A.: “Forschungsthemen-und ziele”, Otto von Guericke Universität, Forschungsbericht 2001, página 229, sugiere realizar más trabajo de investigación con nanopartículas con el fin de tratar tumores. En particular, se sugiere unir, entre otras cosas, ADN antisentido a nanopartículas con el fin de atravesar la barrera hematoencefálica. No existe información contenida con respecto a la naturaleza de las nanopartículas que deberían utilizarse para este objetivo. De este modo, esta referencia no menciona los monómeros utilizados para la polimerización de las nanopartículas y, además, no menciona los alquilcianoacrilatos para producir estas nanopartículas.

US 6.248.720 describe la transfección de genes o ADN en células *in vivo* con micropartículas. Se describen varios materiales para producir las micropartículas, y se indica que las micropartículas bioadhesivas preferidas comprenden polianhídridos. Los alquilcianoacrilatos no se mencionan en la misma.

WO 00/74658 describe que las nanopartículas fabricadas de un material polimérico se pueden utilizar para dirigir una sustancia fisiológicamente activa a un sitio específico en el cuerpo de un mamífero. Sin embargo, no habla sobre material genético como sustancia efectiva para ser transportada por nanopartículas.

Un objetivo de la presente invención era aplicar la estrategia de transportar fármacos para el tratamiento del cáncer y ADN a través de la barrera hematoencefálica a sustancias adicionales eficaces en el tratamiento de cánceres, particularmente de gliomas y glioblastomas. Un objetivo adicional de la presente invención era utilizar nanopartículas para dirigir nuevos agentes y fármacos eficaces en el tratamiento del cáncer a áreas específicas del cuerpo humano o animal y, particularmente, para pasar dichos fármacos y agentes a través de la barrera hematoencefálica. Un objetivo adicional de la presente invención era proponer un medio para una transfección de moléculas de ADN en células *in vitro* más eficaz y más económica. Un objetivo adicional de la presente invención era incluir en el gen a expresar un promotor inducible que controla la expresión del gen en la célula en la que se transfectan.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que no sólo los fármacos anteriores (y muchos otros) se pueden transportar a través de la barrera hematoencefálica mediante nanopartículas recubiertas de manera adecuada, sino también macromoléculas, tales como genes que suprimen la actividad del cáncer, se pueden unir a (o incorporar a) nanopartículas adecuadas y, a continuación, se pueden transportar fácilmente a través de la barrera hematoencefálica para la supresión eficaz de la actividad cancerígena por un promotor específico transportado de manera simultánea. También se observó sorprendentemente que las nanopartículas son un medio muy eficaz y barato para transfectar moléculas de ADN en células eucariotas *in vitro* en una vía de liberación no viral. También era sorprendente que se pueda controlar la acción de la expresión génica, de manera que se puedan reducir los efectos tóxicos inducidos por la expresión génica y se pueda disminuir la probabilidad de que las células se vuelvan resistentes al producto génico.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de nanopartículas cargadas con genes para la transfección de ADN en células *in vitro* e *in vivo*, preferiblemente en células eucariotas, más preferiblemente en el cerebro, y aún más preferiblemente en el cerebro de pacientes que padecen de cáncer de cerebro, según la reivindicación 1.

Además del uso en el cerebro de las nanopartículas cargadas con genes, también se puede realizar en otros órganos del mamífero afectados por tumores. Para dar sólo unos pocos ejemplos, dichos otros órganos pueden ser el hígado, los riñones, el intestino, el estómago, los pulmones y los testículos.

La presente invención también describe un proceso de administración de ADN a un órgano diana en el cuerpo humano o animal, cuyo proceso comprende

- preparar nanopartículas en una ruta de síntesis conocida *per se*;
- cargar dichas nanopartículas con ADN;

## ES 2 314 097 T3

- administrar dichas nanopartículas cargadas de ADN al cuerpo humano o animal en una cantidad suficiente para obtener una concentración de ADN eficaz en el órgano diana.

La presente invención también va dirigida a un medicamento según la reivindicación 2.

La presente invención también se refiere al uso de nanopartículas obtenidas mediante un proceso descrito en detalle a continuación para la administración de ADN a un órgano diana en un cuerpo humano o animal.

La presente invención también se refiere al uso de nanopartículas obtenidas mediante un proceso descrito en detalle a continuación para la fabricación de un medicamento contra tumores en un órgano diana del cuerpo humano o animal.

La presente invención finalmente también describe un procedimiento de tratamiento centrado en una diana del cuerpo humano o animal para evitar y/o tratar terapéuticamente el cáncer, cuyo método comprende administrar al cuerpo una cantidad eficaz de uno o más de un ADN eficaz contra el cáncer, siendo dicho ADN administrado en una forma combinada con nanopartículas.

El término “nanopartículas”, tal como se utiliza en la presente invención, indica una estructura portadora que es biocompatible y suficientemente resistente a la destrucción química y/o física por el medio de uso, de manera que una cantidad suficiente de nanopartículas permanece sustancialmente intactas después de la entrada en el cuerpo humano o animal tras la administración intraperitoneal u oral o intravenosa para ser capaces de alcanzar el órgano diana deseado, por ejemplo, el cerebro, el hígado, los riñones, etc. Normalmente, las nanopartículas son partículas coloidales sólidas. Los fármacos u otros materiales relevantes (por ejemplo, aquellos utilizados con fines de diagnóstico en medicina nuclear o en terapia por radiación y/o aquellos utilizados para fines de prevención y/o terapéuticos) se pueden disolver en las nanopartículas atrapadas, encapsuladas y/o adsorbidas o adheridas.

Las nanopartículas son partículas sintéticas fabricadas de material polimérico natural o sintético. Las partículas tienen un diámetro por debajo de 1000 nm, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 1000 nm.

En el proceso y el uso de la presente invención, las nanopartículas comprenden un material polimérico que se selecciona del grupo que consiste en polialquilcianoacrilatos, preferiblemente polibutilcianoacrilatos. Entre los materiales monoméricos particularmente adecuados para fabricar nanopartículas biodegradables mediante la polimerización de emulsión en una fase continua acuosa se incluyen alquilcianoacrilatos (preferiblemente butilcianoacrilatos). Otras nanopartículas se fabrican mediante técnicas diferentes a partir de alquilcianoacrilatos. Se ha publicado un resumen de materiales y métodos de fabricación (véase, J. Kreuter (1991) Nanoparticles-preparation and applications. En: M. Donbrow (Ed.) Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. CRC Press, Boca Raton, Florida, páginas 125 a 141). Los materiales poliméricos que se forman a partir de precursores monoméricos y/u oligoméricos en la etapa de polimerización/generación de nanopartículas, son conocidos *per se* de la técnica anterior, como lo son también los pesos moleculares y la distribución de pesos moleculares del material polimérico que una persona experta en la materia de la fabricación de nanopartículas puede seleccionar de manera adecuada de acuerdo con el conocimiento habitual. En este aspecto, se hace referencia a Kreuter *et al.*, loc. cit., y las referencias citadas en la presente invención.

El término “ADN”, tal como se utiliza en la presente memoria y las reivindicaciones, se refiere básicamente a cualquier ADN concebible en el presente campo de la técnica. En realizaciones preferidas, el término “ADN” pretende comprender dos tipos de ADN, es decir, ADN plásmido, más preferiblemente ADN plásmido que comprende la información de genes supresores de tumores, incluso más preferiblemente ADN plásmido que comprende la información de los genes supresores de tumores p53 y pRB, por un lado, y oligonucleótidos antisentido, más preferiblemente oligonucleótidos antisentido contra oncogenes, incluso más preferiblemente oligonucleótidos antisentido contra oncogenes, tal como Bc12, por el otro lado. Se puede utilizar un tipo de ADN (y, consecuentemente, un tipo de nanopartículas cargadas con ADN) en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar dos o más tipos de ADN, que dan lugar a una pluralidad de tipos de nanopartículas cargadas con diferentes tipos de ADN y utilizables según la presente invención.

Sorprendentemente, el ADN y particularmente el ADN de los dos tipos anteriores se podían incorporar o adsorber a nanopartículas y los dos complejos ADN-nanopartícula resultantes se podían inocular en el organismo, particularmente en el organismo que padece cáncer (específicamente, pero sin limitación, el cáncer de cerebro). A continuación, se podía observar la supresión de la proliferación tumoral, e incluso se podía inducir una necrosis tumoral y apoptosis.

En una realización preferida, pero no esencial, de la invención, el ADN plásmido que comprende un promotor, más preferiblemente el ADN plásmido que comprende un promotor inducible, se puede incorporar en las nanopartículas. Como la etapa novedosa se incluye, en el ADN cargado o en la nanopartícula y a expresar en la célula, un promotor inducible, se puede conseguir un control externo de la expresión del gen relevante, y el gen se puede conectar y desconectar según se desee. Como ventaja inesperada sobre la técnica anterior, se puede controlar la acción de la expresión de gen/ADN. Dicho control puede reducir los efectos secundarios tóxicos de una expresión continua de genes y/o puede reducir la probabilidad de que las células se vuelvan resistentes a los productos génicos, produciendo una selección negativa.

En una realización preferida de la presente invención, se utilizó la región reguladora en dirección 5' del virus del papiloma humano (HPV-URR) como promotor inducible. La expresión de supresor de tumores se induce después de

la administración de Dexametasona u otros inductores o compuestos. De este modo, se podía conseguir la apoptosis de las células tumorales, así como la regresión de tumor. Otros promotores de ejemplo utilizables según la presente invención con el promotor del virus citomegalia (CMV) o el promotor del virus de simio 40 (SV 40).

5 Además, se podían conseguir efectos intensos que incluyen una regresión tumoral mediante una administración de combinación de uno o más de un tipo de nanopartículas que contienen ADN y nanopartículas que contienen una o más de una sustancia citostáticamente eficaces. En una realización preferida, el ADN supresor de tumores, incluso más preferido detrás de un promotor inducible, se puede inyectar antes de la inoculación de un complejo de nanopartículas que contiene un compuesto citostáticamente eficaz. En una realización incluso más preferida de la administración de  
10 combinación, el compuesto citostáticamente eficaz es Doxorubicina.

En el proceso de transfección de ADN en células, y también en el proceso de administración de un ADN a un órgano diana en el cuerpo humano o animal, la primera etapa comprende la preparación de nanopartículas en una ruta de síntesis conocida *per se*. Se puede utilizar básicamente cada ruta de síntesis adecuada para la preparación de nano-  
15 partículas adecuadas para la administración de ADN. En una realización preferida del proceso, la síntesis se inicia a partir de uno de los materiales monoméricos, siendo la base química para los polímeros mencionados anteriormente. El material monomérico, u opcionalmente más de uno de los materiales monoméricos mencionados anteriormente, se polimerizan, preferiblemente en una etapa de polimerización entre fases, en un no-disolvente adecuado para las nanopartículas generadas. Como es habitual y descrito en detalle en la técnica anterior a los que se hace referencia  
20 anteriormente, la polimerización se realiza en presencia de un estabilizante adecuado a temperaturas y en concentraciones conocidas para un experto en la materia, por ejemplo, a partir de las referencias anteriores.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el proceso de preparación de las nanopartículas puede comprender la etapa de inclusión de un estabilizantes en las nanopartículas. Por tanto, en tal caso, el estabilizante debe ser  
25 un componente esencial de la composición para la preparación de nanopartículas. Un estabilizante puede ser preferiblemente un compuesto que tiene propiedades tensioactivas.

En realizaciones preferidas, sólo se utiliza un estabilizante. En este caso, el transporte del ADN a una diana específica en el interior o sobre el cuerpo humano o animal se puede conseguir de una manera ideal. Por ejemplo, se puede  
30 transportar un ADN y permitir que atraviese la barrera hematoencefálica (bbb) de una manera eficaz, de manera que la cantidad de sustancia eficaz en el punto de efecto aumenta de manera considerable, y la dosis administrada al humano o animal se puede correspondiente reducir. Sin embargo, también es posible utilizar más de uno, por ejemplo, dos o más estabilizantes.

35 Básicamente, cada estabilizante que permite conseguir el objeto de la presente invención es adecuado para ser incorporado en el sistema de reconocimiento de fármacos de la invención.

En realizaciones preferidas de la presente invención, dicho estabilizante para las nanopartículas que se utiliza para la transfección del ADN en células o para la administración de ADN de una manera dirigida se selecciona del  
40 grupo que consiste en estabilizantes que permiten evitar la aglomeración de nanopartículas. Más específicamente, el estabilizante se puede seleccionar entre compuestos que fortalecen el enlace ente el ADN y las nanopartículas.

En procesos específicamente ventajosos de preparación de nanopartículas, dicho estabilizante comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en polisorbatos, preferiblemente polisorbato 80, polisorbato 85, polisorbato  
45 81; dextranos y derivados de los mismos, preferiblemente, dextrano 12.000, dextrano 70.000, dietilaminoetil-(DEAE) dextrano, ésteres de ácidos carboxílicos de alcoholes multifuncionales, poloxámeros, poloxaminas, éteres alcoxilados, ésteres alcoxilados, mono-, di- y triglicéridos alcoxilados, fenoles alcoxilados y difenoles, sustancias de la series Genapol® y Bauki®, sales metálicas de ácidos carboxílicos, sales metálicas de sulfatos de alcohol y sales metálicas de sulfosuccinatos y mezclas de dos o más de dichas sustancias. Por ejemplo, dicho estabilizante comprende una  
50 sustancia seleccionada del grupo que consiste en polisorbato 80, polisorbato 85, polisorbato 81, dextrano 12.000, dextrano 70.000, DEAE-dextrano, ésteres de ácidos carboxílicos y preferiblemente, ésteres de ácidos grasos de glicerol y sorbitol, incluso más preferiblemente monoestearato de glicerol, monoestearato sorbitano y monooleato sorbitano, poloxámero 188 (Pluronic® F68), éteres etoxilados, ésteres etoxilados, triglicéridos etoxilados, fenoles y difenoles etoxilados, sales metálicas de ácidos grasos y sales metálicas de sulfatos de alcohol graso, preferiblemente sales só-  
55 dicas de ácidos grasos y de sulfatos de alcohol graso, incluso más preferiblemente estearato sódico y lauril sulfato sódico y mezclas de dos o más de dichas sustancias.

En el proceso de la invención, ha resultado que las nanopartículas producen resultados especialmente buenos, si el estabilizante de las nanopartículas utilizado en el proceso de preparación comprende una sustancia seleccionada entre  
60 DEAE-dextrano y mezclas del mismo con otros estabilizantes, tal como se ha mencionado anteriormente. Cuando se utilizan dichas partículas, se podía realizar muy bien la etapa de dirigir la sustancia o sustancias fisiológicamente eficaces en un sitio específico en el interior o sobre el cuerpo humano o animal. En particular, en la etapa de dirigir el ADN a la barrera hematoencefálica y penetrar dicha sustancia o sustancias la bbb sin aglomeración de las partículas, se observó una cantidad eficaz relativamente elevada del ADN en el cerebro disponible para la acción en el tumor. De  
65 este modo, la eficacia del paso de dicha sustancia a través de la bbb se podía aumentar, mientras la cantidad de nanopartículas se podía reducir de manera particular si las nanopartículas contenían DEAE dextrano como estabilizante, opcionalmente mezclado con otros estabilizantes.

## ES 2 314 097 T3

En una realización preferida de la presente invención, el proceso de preparación de las nanopartículas puede comprender la etapa de aplicar un recubrimiento a las nanopartículas con el fin de permitir que el ADN se pueda transportar fácilmente al órgano diana y/o pase a través de la barrera hematoencefálica. Básicamente, también se pueden utilizar en la presente invención todos los recubrimientos descritos en la técnica anterior que permiten que las nanopartículas y/o sus componentes farmacológicos pasen la barrera hematoencefálica. Se puede utilizar una sustancia como recubrimiento, o un conjunto de sustancias (dos, tres, etc. sustancias) se pueden utilizar como material de recubrimiento. En una realización preferida, el recubrimiento puede comprender o consistir en Polisorbato 80 (disponible comercialmente como Tween® 80 de ICI). El polisorbato 80 se puede utilizar solo o combinado con otros materiales de recubrimiento adecuados, como, por ejemplo, con Poloxámeros (disponible comercialmente como Pluronic® de BASF Wyandotte). Las cantidades de material de recubrimiento utilizado en la preparación de las nanopartículas se pueden seleccionar fácilmente por un experto en la materia según las cantidades de recubrimiento utilizadas en la técnica anterior. En una realización particularmente preferida, la cantidad de material de recubrimiento, cuando se preparan nanopartículas según el proceso de la presente invención, se encuentra en el intervalo de 0,1 a 100 mg/ml de solución de recubrimiento, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 mg/ml, incluso más preferiblemente en el intervalo de 5 a 20 mg/ml, por ejemplo 10 mg/ml.

La tercera etapa del proceso de transfección de la presente invención comprende la etapa de adición de la nanopartículas cargadas con ADN al cultivo de células, en las que el ADN va a transfectarse. En una realización preferida de la presente invención, esto se realiza en un medio de cultivo habitual y, más preferiblemente, durante un tiempo suficiente para permitir que el ADN se transfecte en las células. El tiempo (al igual que otras condiciones de la reacción) se puede seleccionar libremente por un experto en este campo de la técnica sin ninguna limitación, particularmente, se pueden determinar las condiciones de reacción en uno o dos experimentos de prueba orientativos. En realizaciones más preferidas, el tiempo para incubar las nanopartículas cargadas con ADN con las células en el cultivo se encuentra en un intervalo de 1 h a 72 h, incluso más preferiblemente en un intervalo de 6h a 36 h y los más preferiblemente en un tiempo de 12 h a 30 h, por ejemplo 24 h. La concentración de nanopartículas cargadas con ADN en el medio de cultivo para la etapa de transfección se encuentra preferiblemente en el intervalo de 1  $\mu$ g a 20  $\mu$ g, incluso más preferiblemente en el intervalo de 1  $\mu$ g a 10  $\mu$ g, por ejemplo de 1  $\mu$ g a 6  $\mu$ g. Las temperaturas son temperaturas de cultivo habituales para células y se pueden encontrar preferiblemente en el intervalo de 20 a 40°C, más preferiblemente en el intervalo de 30 a 37°C. En realizaciones específicas de la presente invención, se puede utilizar sólo un medio de cultivo. Sin embargo, se encuentra en la experiencia y conocimiento de un experto en el presente campo que se pueden utilizar diferentes medios de cultivo en el transcurso del procedimiento de transfección. Por ejemplo, en el uso de la presente invención, se prefiere que el complejo de nanopartículas y ADN se añada al medio de cultivo normal que es, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado (MEM) o Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM), y las nanopartículas cargadas con ADN se incuban con las células en dicho cultivo durante un cierto tiempo, por ejemplo, 5 h. Cinco horas después de la adición, se cambia el medio de cultivo, preferiblemente a medio nuevo, incluso más preferiblemente a medio nuevo del mismo tipo, y las células se cultivan durante otro periodo de tiempo, por ejemplo, durante otras 24 h, en condiciones normales, por ejemplo (sin limitación) a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. La determinación de una transfección satisfactoria del ADN en las células se puede llevar a cabo de las maneras habituales, las vías preferidas de las cuales son una visualización de la expresión de genes informadores después de la fijación de las células mediante reacción química o mediante fluorescencia. Además, se analiza la transcripción de otros genes mediante, por ejemplo, la técnica de transferencia Northern.

La tercera del proceso de administración de la presente invención es la administración de las nanopartículas cargadas con ADN, preparadas y cargadas en las dos etapas previas tal como se ha descrito anteriormente, al cuerpo humano o animal en una cantidad suficiente para obtener una concentración de ADN eficaz en un órgano diana.

La administración se puede realizar por cada vía adecuada. Por ejemplo, las nanopartículas cargadas con ADN se pueden administrar por vía oral, subcutánea, intravenosa, o intraperitoneal, y se prefieren particularmente las vías intravenosa o intraperitoneal. En realizaciones específicas de la presente invención, también es posible una combinación de más de una de las vías mencionadas anteriormente. El ADN se transporta al órgano diana, portado por las nanopartículas, donde el proceso de la presente invención consigue de manera particular un reconocimiento del ADN en los órganos específicos, mientras que otros se dispondrán sin el ADN. Esto permite la reducción de la dosis de nanopartículas cargadas con ADN y permite simultáneamente la prevención de efectos secundarios en otros sitios del cuerpo humano o animal.

En cualquier caso, la concentración de ADN obtenida en el órgano diana debe ser una concentración eficaz en el tratamiento del cáncer.

En una realización particularmente preferida, se podría aprender que, con el fin de obtener la concentración anterior en el órgano diana, la cantidad de nanopartículas cargadas con ADN por unidad de dosificación debería estar en el intervalo de mg a 20 mg, basado en 1 kg de peso corporal de humano o animal a tratar. Se deberían administrar por día de 1 a 4 unidades de dosificación, preferiblemente de 1 a 3 unidades de dosificación, con el fin de obtener el efecto anticancerígeno deseado en el órgano diana.

Según la presente invención, las nanopartículas cargadas con ADN seleccionado del grupo que consiste en ADN plásmido y oligonucleótidos antisentido se pueden utilizar para un tratamiento eficaz de cánceres, particularmente si el órgano diana es el cerebro. Otros órganos dianas pueden ser el hígado, los riñones, el intestino, el estómago,

los pulmones y los testículos. Después de utilizar las nanopartículas cargadas con ADN, la concentración de ADN eficaz en el órgano diana se podía aumentar considerablemente en comparación con el caso de la administración de ADN no cargado en nanopartículas. Particularmente, en los casos en los que la administración de nanopartículas cargadas con ADN se combina con la administración de nanopartículas cargadas con un medicamento anticancerígeno/sustancia citostáticamente eficaz, se podía conseguir la apoptosis de células tumorales y una regresión sustancial del tumor.

La presente invención también se refiere al uso de nanopartículas cargadas con ADN para la administración de ADN a un órgano diana en el cuerpo humano o animal. Dicho uso puede ser un uso en el que las nanopartículas están cargadas con ADN (un ADN o un conjunto de ADNs) solo o un uso en el que las nanopartículas están cargadas con ADN (un ADN o un conjunto de ADNs) que comprende un promotor inducible. En el último caso, el ADN o ADNs que comprende un promotor inducible se puede administrar al cuerpo mediante nanopartículas. En una realización preferida, el ADN es un tipo de ADN o es más de un tipo de ADN, por ejemplo, dos tipos de ADN que están cargados en el mismo tipo de nanopartículas o en diferentes tipos de nanopartículas para dar lugar a un tipo o dos tipos diferentes de nanopartículas cargadas con ADN. En realizaciones preferidas de dicho uso, el ADN es ADN relacionado con el tratamiento del cáncer y, más preferiblemente, se selecciona del grupo que consiste en ADNs plásmidos y oligonucleótidos antisentido, preferiblemente del grupo que consiste en ADNs plásmidos que comprenden la información de los genes supresores de tumores y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes. En una realización aún más preferida, el ADN se selecciona del ADN plásmido que comprende la información de los genes supresores de tumores p53 y pRB y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes, tales como Bcl2 o Tgf $\beta$ .

La presente invención se refiere además al uso de nanopartículas cargadas con ADN para la fabricación de un medicamento contra tumores en un órgano diana del cuerpo humano o animal. Dicho uso puede ser un uso en el que las nanopartículas están cargadas con ADN (un ADN o un conjunto de ADNs) solo o un uso en el que las nanopartículas están cargadas con ADN (un ADN o un conjunto de ADNs) que comprende un promotor inducible para dicho ADN o ADNs. En el último caso, el ADN o ADNs que comprenden un promotor inducible se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento. El órgano diana de destino puede ser preferiblemente el cerebro. En otras realizaciones, los órganos diana pueden ser uno o más órganos seleccionados del grupo que consiste en el cerebro, el hígado, los riñones, el intestino, el estómago, los pulmones y los testículos. En una realización preferida, el ADN es un tipo de ADN o es más de un tipo de ADN, por ejemplo, dos tipos de ADN que están cargados en el mismo tipo de nanopartículas o en diferentes tipos de nanopartículas para dar lugar a un tipo o dos tipos diferentes de nanopartículas cargadas con ADN. En realizaciones preferidas de dicho uso, el ADN es ADN relacionado con el tratamiento del cáncer e, incluso más preferiblemente, se selecciona del grupo que consiste en ADNs plásmidos y oligonucleótidos antisentido, preferiblemente del grupo que consiste en ADNs plásmidos que comprenden la información de los genes supresores de tumores y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes. En una realización aún más preferida, el ADN se selecciona del ADN plásmido que comprende la información de los genes supresores de tumores p53 y pRB y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes, tales como Bcl2 o Tgf $\beta$ . Dichos medicamentos basados en nanopartículas pueden ser inmensamente ventajosos sobre fármacos y sustancias químicas anticancerígenas habituales, ya que se pueden administrar fácilmente a un paciente, o un paciente puede tomar por sí solo los medicamentos sin los riesgos que previenen, hasta ahora, una automedicación en casos de cáncer. Además, tal como se ha indicado anteriormente, dichos medicamentos se pueden combinar con nanopartículas cargadas con medicamentos anticancerígenos y, particularmente, agentes citostáticamente eficaces. Mediante dichas combinaciones, se puede realizar un tratamiento incluso más eficaz de tumores no tratables en otros casos.

Particularmente, con las nanopartículas cargadas con ADN utilizadas en el campo de la presente invención, el ADN relacionado con el tratamiento del cáncer, opcionalmente en combinación con otros medicamentos y agentes relacionados con el tratamiento del cáncer, se pueden dirigir a un órgano específico en el cuerpo humano o animal, específicamente a un órgano afectado por un tumor. En una realización particularmente preferida, el órgano afectado por el tumor es el cerebro, y la administración de las nanopartículas que tienen adsorbidas a las mismas o adsorbidas sobre las mismas o incluidas en las mismas uno o más de un ADN permite el paso de dicho ADN a través de la barrera hematoencefálica. Particularmente, es posible el tratamiento dirigido de carcinomas malignos, tales como gliomas malignos, astrositos anaplásicos, glioblastomas y, particularmente, del glioblastoma multiforme.

Las nanopartículas cargadas con ADN utilizadas en la presente invención también son utilizables en el tratamiento terapéutico de genes de enfermedades hereditarias. Ejemplos de dichas enfermedades hereditarias son síndrome adrenogenital (AGS), déficit de alfa-1 tripsina, resistencia a la APC tipo leiden, corea de Huntington, fibrosis quística, mutación del factor V leiden, síndrome X frágil, síndrome de gaucher, hemocromatosis, homocistinuria, hipercolesterolemia, hiperlipidemias tipo III, secuencia de lisencefalitis aislada, síndrome de cri-du-chat, síndrome de lesch-nyhan, lisencefalitis, síndrome de Miller-dieker, morbus osler, morbus fabry, mucoviszidosis, musculodistrofia, fenilcetonuria, mutación de la protrombina, retinoblastoma y síndrome de Walker-warburg.

Resumiendo las ventajas, las nanopartículas cargadas con ADN utilizadas según la presente invención se pueden disponer fácilmente en la terapia anticancerígena específica debido a su propiedad de que son dirigidas específicamente a un órgano diana en el cuerpo humano o animal sin afectar a otros órganos. Esto permite la reducción de la administración de agentes citostáticamente eficaces. En combinación con éstas, se pueden reducir considerablemente dosis de citostáticos que producen efectos secundarios y perjudiciales.

## ES 2 314 097 T3

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Los ejemplos se refieren sólo a realizaciones preferidas y no deberían interpretarse que limitan la presente invención.

### Ejemplos

5

#### Ejemplo 1

10 La carga de ADN mediante adsorción en las nanopartículas se podía realizar de la siguiente manera: 10 mg de nanopartículas de PBCA-(DEAE dextrano) liofilizadas se prepararon mediante polimerización, en una vía habitual para la fabricación de nanopartículas, de butil cianoacrilato al correspondiente polímero (polibutil cianoacrilato = PBCA) que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1.547 g/mol y que contiene Dextrano 70.000 y dietilaminoetil dextrano (DEAE-dextrano) en una proporción molar de 1,5 a 1 como estabilizante. Las nanopartículas que tienen un diámetro promedio de aproximadamente 200 a 300 nm se resuspendieron en 1 ml de una solución de tampón fosfato que tenía un pH de 4,5 a 5,5 con agitación. Se añadieron a la suspensión de 20 a 150  $\mu\text{g/ml}$  de ADN (ADN plásmido que comprende la información del gen supresor de tumores p53) en tampón fosfato o, 15 alternativamente, en agua), continuando la agitación durante 4 a 16 horas. Después de la centrifugación de la mezcla, se analizó el sobrenadante mediante espectroscopía UV. Se recuperó el residuo de nanopartículas cargadas con ADN y se resuspendió en 1 ml de agua filtrada millipore. Se añadieron 10 mg de Tween® 80 a la suspensión con el fin de proporcionar un recubrimiento a las nanopartículas. La suspensión se agitó durante 30 minutos, seguida de la 20 centrifugación para eliminar el componente de recubrimiento no unido. El residuo resultante se resuspendió de nuevo en 1 ml de solución salina de NaCl al 0,9%; la suspensión así obtenida estaba lista para la inyección.

#### Ejemplo 2

25

Para la transfección de ADN en las células *in vitro*, se añadió un complejo de nanopartículas y ADN (ADN plásmido que comprendía la información del gen supresor de tumores p53) a células cultivadas en D-MEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco). 5 horas después de la adición del complejo de nanopartículas y ADN, se cambió el medio (a D-MEM nuevo) y se incubó adicionalmente a 37°C durante 24 horas. Se visualizó la expresión de los genes 30 informadores (informador =  $\beta$ -galactosidasa, proteína de luz verde, después de un promotor heterólogo) después de la fijación de las células mediante reacción química o fluorescencia. La transcripción de otros genes se analizó mediante Transferencia Northern.

#### Ejemplo 3

35

La eficacia de nanopartículas cargadas con genes informadores (informador =  $\beta$ -galactosidasa, proteína de luz verde, después de un promotor heterólogo) se analizó adicionalmente en un test modelo con ratas. Las ratas de la cepa CD Fisher se inocularon intracranalmente con células de las líneas de células de glioma C6, F98 o RG2, las últimas dando lugar a un rápido crecimiento de tumores. 40

Se narcotizaron ratas macho Fisher CD (edad: 15 semanas, 250 g) con Ketanest (80 mg/kg, i.p.) y, a continuación, Rompun (12,5 mg/kg i.m.). A continuación, se fijó la cabeza en un aparato estereotáctico y se abrió (3 a 4 mm lateral, lado derecho próximo al bregma, diámetro del agujero, 1 mm), mediante un taladro de alta velocidad. Mediante una 45 aguja de 26G conectada a una micro-jeringa Hamilton, se inocularon  $1 \times 10^3$  células tumorales suspendidas en un medio sin suero (3  $\mu\text{l}$ ) en una profundidad de 4 mm en el cerebro. La sutura se cerró mediante grapas.

En un test histológico, se determinó la distribución de las nanopartículas cargadas con ADN mediante la administración sistemática a los animales de una suspensión de complejo ADN-nanopartícula cargado con genes informadores 50 en una cantidad de 5 mg/500  $\mu\text{l}$  (el volumen inyectado fue de 500  $\mu\text{l}$ ). Se realizó una perfusión después de 24 horas y después de 5 días. Los cortes troceados del criostato no teñidos de todos los órganos sirvieron para determinar la localización de las partículas fluorescentes mediante la observación de los trozos con un microscopio fluorescente. La localización exacta se determinó con trozos paralelos teñidos con azul de metileno. Se encontró la expresión de genes informadores en el cerebro, el hígado, el bazo, los riñones y los intestinos, de manera más dominantes en el tejido de 55 tumor cerebral.

### Referencias citadas en la descripción

60 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

65

- WO 9522963 A [0002]
- WO 9856361 A [0002]

## ES 2 314 097 T3

- WO 0074658 A [0002] [0011]

- US 6248720 B [0004] [0010]

5      • US 180000 A [0005]

### Documentos que no son patentes citados en la descripción

10      • Nanoparticles-preparation and applications. **KREUTER**. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. *CRC Press*, 1991, 125-141 [0023]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso de nanopartículas cargadas con ADN para la transfección de ADN en células *in vitro*, en el que las células son preferiblemente células eucariotas, más preferiblemente células eucariotas en cultivo y/o en el que el ADN se selecciona del grupo que consiste en ADNs plásmidos y oligonucleótidos antisentido, preferiblemente del grupo que consiste en ADNs plásmidos que comprenden la información de genes supresores de tumores y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes, y/o en el que el ADN se transfecta bajo el control de un promotor inducible, en el que las nanopartículas se prepararon mediante polimerización a partir de un monómero seleccionado entre alquilcianoacrilatos.

10 2. Medicamento para la administración intraperitoneal o intravenosa que contiene nanopartículas cargadas con ADN para la administración de ADN a un órgano diana en el cuerpo humano o animal, en el que las nanopartículas se prepararon mediante polimerización a partir de un monómero seleccionado entre alquilcianoacrilatos, y en el que el medicamento comprende preferiblemente además nanopartículas cargadas con un medicamento anticancerígeno, preferiblemente con un agente citostáticamente eficaz.

15 3. Medicamento según la reivindicación 2, en el que se utiliza un estabilizante en el transcurso de la polimerización de dicho monómero o monómeros a las nanopartículas, preferiblemente en el que se utiliza dietilaminoetil dextrano como estabilizante.

20 4. Medicamento según las reivindicaciones 2 ó 3, en el que se aplica un recubrimiento a las nanopartículas, preferiblemente un recubrimiento tensioactivo, más preferiblemente un recubrimiento fabricado de Tween 80, y/o en el que el ADN se selecciona del grupo que consiste en ADNs plásmidos y oligonucleótidos antisentido, preferiblemente del grupo que consiste en ADNs plásmidos que comprenden la información de genes supresores de tumores y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes.

25 5. Medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que proporciona una concentración de ADN en el órgano diana en una concentración eficaz para el tratamiento del cáncer o en una concentración eficaz para el tratamiento de enfermedades hereditarias y/o en el que la cantidad de nanopartículas cargadas con ADN por unidad de dosificación se encuentra en el intervalo de 5 a 20 mg/kg de peso corporal y/o en el que la administración se encuentra en forma de 1 a 4 unidades de dosificación por día, preferiblemente de 1 a 3 unidades de dosificación por día.

30 6. Uso de nanopartículas cargadas con ADN que comprenden opcionalmente un promotor inducible para la fabricación de un medicamento para la administración intraperitoneal o intravenosa contra tumores en un órgano diana del cuerpo humano o animal, en el que las nanopartículas se prepararon mediante polimerización a partir de un monómero seleccionado entre alquilcianoacrilatos, y en el que el ADN es preferiblemente un ADN relacionado con el tratamiento del cáncer.

35 7. Uso según la reivindicación 6, en el que el ADN se selecciona del grupo que consiste en ADNs plásmidos y oligonucleótidos antisentido, preferiblemente del grupo que consiste en ADNs plásmidos que comprenden la información de genes supresores de tumores y oligonucleótidos antisentido contra oncogenes y/o en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en la región reguladora en dirección 5' del virus del papiloma humano (HPV-URR), el promotor del virus citomegalia (CMV) y el promotor del virus de simio (SV 40).

40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el órgano diana es un órgano diana afectado por un tumor, en el que el órgano u órganos diana son preferiblemente el cerebro, el hígado, los riñones, el intestino, el estómago, los pulmones y/o los testículos, preferiblemente en el que el órgano diana es el cerebro, y/o en el que el tumor se selecciona del grupo que consiste en gliomas malignos, astrocitomas anaplásicos, glioblastomas y glioblastoma multiforme.

45 9. Proceso de preparación de nanopartículas cargadas con ADN, que comprende:

- 50
- 55 - preparar nanopartículas en una ruta de síntesis conocida *per se*; donde las nanopartículas se preparan mediante la polimerización a partir de un monómero seleccionado entre alquilcianoacrilatos; y
  - cargar dichas nanopartículas con ADN en una cantidad suficiente para obtener una concentración de ADN eficaz en el órgano diana,
  - 60 - donde dicho ADN o ADNs comprenden opcionalmente un promotor inducible.

10. Proceso según la reivindicación 9, en el que las nanopartículas comprenden una sustancia del grupo que consiste en estabilizantes y recubrimientos, seleccionando el estabilizante preferiblemente del grupo que consiste en estabilizantes que permiten evitar la aglomeración de nanopartículas y estabilizantes que potencian el enlace entre el ADN o ADNs y las nanopartículas, más preferiblemente estabilizantes seleccionados del grupo que consiste en polisorbato 80, polisorbato 81, polisorbato 85, dextrano 12.000, dextrano 70.000, dietilaminoetil (DEAE) dextrano, ésteres de ácidos grasos de glicerol y sorbitol, poloxámero 188, éteres etoxilados, ésteres etoxilados, fenoles y difenoles etoxila-

## ES 2 314 097 T3

dos, sales metálicas (preferiblemente sales sódicas) de ácidos grasos y de sulfatos de alcohol graso, y mezclas de dos o más de dichas sustancias.

5 11. Proceso según la reivindicación 10, en el que las nanopartículas están recubiertas por una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Tween R 80, otros polisorbatos, poloxámeros y polietilenglicol.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65