

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902090689A1

Publication Date

20140409

Applicant

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI CAMERINO

Title

NANOPARTICELLE LIPIDICHE MULTICOMPONENTI E PROCEDIMENTI PER  
LA LORO PREPARAZIONE.

## **"NANOPARTICELLE LIPIDICHE MULTICOMPONENTI E PROCEDIMENTI PER LA LORO PREPARAZIONE"**

### DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda il campo della terapia genica, in particolare  
5 riguarda nuove nano particelle lipidiche multicomponenti per il trasporto non virale di  
acidi nucleici e procedimenti per la loro preparazione e loro uso nella terapia genica.

### STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

La terapia genica consiste nel trasferimento di materiale genetico  
all'interno di una cellula allo scopo di alterarne transitoriamente o permanentemente il  
10 fenotipo. Offre nuove possibilità di trattamento per numerose patologie, sia ereditarie  
che acquisite, che le procedure cliniche convenzionali non sono in grado di curare  
efficacemente. E' ritenuta perciò la terapia del futuro e negli ultimi anni è stata oggetto  
d'intenso studio e sviluppo per un suo possibile impiego su larga scala in ambito clinico  
("Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and  
15 therapeutic efficacy". Chang, H.; Yeh, M. Int. J. Nanomed. 2012, 7, 49-60). Il primo  
passo consiste nell'identificazione del singolo gene o dei diversi geni responsabili della  
malattia genetica. Ciò è possibile grazie al grande progresso delle metodiche di  
biologia molecolare sviluppatasi a partire dagli anni '80. Tali tecniche consentono il  
clonaggio e il sequenziamento di vari geni. Ciò ha comportato la precisa identificazione  
20 di molte alterazioni geniche in diverse patologie e la capacità, grazie alle tecniche del  
DNA ricombinante, di modificare microorganismi (come batteri o funghi) per poter far  
loro esprimere molecole d'interesse. Il passo successivo consiste nella valutazione  
della possibilità di trasfettare le cellule somatiche di un individuo avente una malattia  
genetica con un segmento di DNA contenente l'allele sano. Quest'approccio si è  
25 successivamente esteso anche a patologie come tumori, infezioni da HIV e altre  
patologie in cui non si va a sostituire un gene difettoso ma se ne aggiunge uno che  
possa mettere in moto un fenomeno terapeuticamente utile.

Componente decisiva del trasporto genico consiste nella veicolazione del DNA  
all'interno delle cellule bersaglio mediante vettori che lo proteggano dalla degradazione  
30 e ne assicurino la trascrizione. I vettori utilizzati sono attualmente distinti in virali e non

virali. I virus hanno un'ottima tendenza ad infettare le cellule e ad inserirvi il proprio DNA sia integrandolo sia sotto forma d'episoma. Di contro, i vettori virali presentano alcuni inconvenienti che ne limitano l'utilizzo come l'attivazione del sistema immunitario, la tossicità e la taglia ridotta del materiale genetico trasportabile  
5 (abitualmente < 40.000 coppie di basi). Quest'ultima proprietà è molto limitante considerando che molti importanti geni umani hanno una lunghezza maggiore di 40.000 coppie di basi se si considerano anche le sequenze regolatrici e gli introni non codificanti. Tra i vettori non-virali, i liposomi cationici, vescicole a doppio strato lipidico costituite di lipidi cationici e lipidi neutri, rappresentano un'attraente opportunità per  
10 l'ingegneria molecolare dal momento che si configurano come veri e propri biomateriali auto-assemblanti in scala micro/nanometrica (Elsabahy et al. "Non-Viral Nucleic Acid Delivery: Key Challenges and Future Directions". *Current Drug Delivery*, 8, 2011, 235-244). In particolare, i complessi liposomi cationici-DNA (lipoplessi) rappresentano i materiali a base lipidica più diffusi. I lipoplessi presentano alcuni considerevoli vantaggi rispetto ai vettori virali quali, ad esempio, facilità di preparazione su larga scala, bassa  
15 tossicità, virtualmente nessun limite sulla taglia del DNA trasportabile. Quest'ultimo aspetto è significativo nell'ipotesi di trasferire all'interno del nucleo della cellula interi cromosomi (la dimensione media dei cromosomi umani è compresa tra 50 e 280 milioni di coppie di basi). A dispetto dei suddetti vantaggi, la limitazione principale dei lipoplessi consiste nella bassa efficienza di trasferimento del materiale genetico (efficienza di trasfezione, TE). Ad oggi, l'approccio primario per aumentare l'efficienza di trasfezione dei lipoplessi è la sintesi di nuove molecole anfipatiche o l'utilizzo di specie lipidiche non cationiche adiuvanti. Recentemente, le nanoparticelle lipidiche stanno emergendo come potenziale alternativa ai lipoplessi poiché presentano  
20 proprietà chimico-fisiche (dimensioni, carica superficiale, abilità a condensare il materiale genetico etc.) più facilmente controllabili. Tali particelle sono costituite di un nucleo di DNA (o short-interfering RNA, siRNA) condensato mediante cationi divalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ), poli-cationi (spermine, spermidine), amminoacidi cationici (arginina, lisina, istidina) e proteine cationiche (protamina, istoni) rivestito da un guscio  
25 lipidico costituito da uno ad alcuni doppi strati lipidici. La metodica di preparazione è

30

consolidata e consiste di due passaggi successivi: (i) la formazione del nucleo di DNA/agente condensante; (ii) il successivo ricoprimento del nucleo DNA/agente condensante con un guscio lipidico. La condensazione del DNA avviene a seguito dell'interazione elettrostatica tra le cariche negative del DNA e le cariche positive del condensante cationico. Al variare del rapporto di mescolamento tra il DNA e l'agente condensante è possibile ottenere nuclei DNA/agente condensante con cariche diverse. Ciò consente di ricoprire il nucleo DNA/agente condensante con gusci lipidici che variano a seconda della carica del suddetto nucleo.

La carica netta della superficie delle nanoparticelle consente una funzionalizzazione non covalente mediante interazione elettrostatica con ligandi di carica opposta. L'attività delle nanoparticelle lipidiche è strettamente connessa alle specifiche proprietà chimico-fisiche della formulazione adottata.

Esistono numerose pubblicazioni nel campo delle nanoparticelle lipidiche, come ad esempio le pubblicazioni del gruppo del dr. L. Zhang dell'università della California a San Diego (UCSD).

Nella pubblicazione "Programmed packaging of multicomponent envelope-type nanoparticle system for gene delivery" Daniela Pozzi, Carlotta Marianecchi, Maria Carafa, Cristina Marchini, Maura Montani, Augusto Amici and Giulio Caracciolo. *Appl. Phys. Lett.* 96, 183702 (2010); doi: 10.1063/1.3427354 si dimostra che una procedura di "impacchettamento programmato" consente di ottenere nanoparticelle lipidiche di dimensioni e carica controllate. I lipidi utilizzati sono lipidi anionici.

Nella pubblicazione "Factors Determining the Superior Performance of Lipid/DNA/Protamine Nanoparticles over Lipoplexes" Giulio Caracciolo, Daniela Pozzi, Anna Laura Capriotti, Carlotta Marianecchi, Maria Carafa, Cristina Marchini, Maura Montani, Augusto Amici, Heinz Amenitsch, Michelle A. Digman, Enrico Gratton, Susana S. Sanchez, and Aldo Laganà. *J. Med. Chem.* 54 (12), pp 4160–4171(2011) sono descritte nanoparticelle costituite di una singola specie lipidica cationica (DOTAP/protamina/DNA). In questa stessa pubblicazione sono discussi i fattori che determinano la maggiore efficienza delle nanoparticelle lipidiche di DOTAP rispetto ai lipoplessi DOTAP/DNA.

In questo settore in continuo sviluppo, ma passibile ancora di ampi miglioramenti, il problema principale riscontrato dai ricercatori consiste nell'individuazione di un nanovettore in grado di superare efficientemente le barriere della trasfezione cellulare. Nell'ottica della commercializzazione e di un utilizzo medico che possa essere approvato e standardizzato, un nanovettore deve presentare le seguenti caratteristiche: (i) dimensioni e carica controllate; (ii) internalizzazione cellulare efficace; (iii) rilascio citoplasmatico del carico genetico completo; (iv) efficiente ingresso nel nucleo; (v) elevata efficienza di trasfezione; (vi) elevata vitalità cellulare.

10

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Al fine di risolvere il problema tecnico sopra indicato gli inventori hanno analizzato numerose formulazioni di nano particelle e hanno individuato una specifica formulazione di nanoparticelle più efficiente dei reagenti comunemente utilizzati per la trasfezione a base lipidica attualmente in commercio. E' stata infatti realizzata una formulazione lipidica a multicomponenti che incorpori i vantaggi di ogni specie lipidica. Sono infatti oggetto della presente invenzione una nanoparticella lipidica multicomponente consistente in un nucleo costituito da una o più molecole di acido nucleico e da uno o più agenti condensanti di acidi nucleici e un rivestimento esterno costituito dai lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e dai fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC); un procedimento per la preparazione di nanoparticelle lipidiche multicomponente comprendente i seguenti passaggi:

25

- a. molecole di acidi nucleici ed un insieme di uno o più agenti condensanti gli acidi nucleici sono sciolti separatamente ad uguale concentrazione in H<sub>2</sub>O distillata e sono quindi miscelati tra loro ad un rapporto compreso tra 1:1 e 1:0,5 ottenendo così un complesso carico negativamente (Per lieve agitazione);
- b. un volume desiderato del complesso ottenuto al punto a. è lasciato equilibrare per un periodo compreso tra 30 e 180 minuti a temperatura ambiente;

- c. si preparano liposomi cationici multicomponente sciogliendo individualmente i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) in un opportuno solvente organico e si miscelano quantità desiderate di ciascun lipide così sciolto  
5 fino ad ottenere una miscela omogenea;
- d. si rimuove completamente il solvente organico dalla miscela ottenuta al punto c. ottenendo così un film lipidico;
- e. il film lipidico ottenuto al punto d. è idratato con un opportuno tampone a pH  
10 fisiologico cellulare fino ad ottenere una concentrazione finale desiderata;
- f. la soluzione lipidica ottenuta al punto e. è sonicata fino ad ottenere una soluzione limpida (che indica la formazione di vescicole uni lamellari qui definite anche come liposomi cationici);
- g. il complesso equilibrato ottenuto al punto b. è fatto interagire con un opportuno  
15 volume della soluzione ottenuta al punto f. ad un rapporto di carica rho ( $\rho$ ) mole di lipide cationico/base di acido nucleico di compreso tra 2 e 3 estremi inclusi ed è incubato a circa 37°C fino a formazione delle nano particelle e dette nanoparticelle per uso nella terapia genica, o un metodo di terapia genica comprendente un passaggio di somministrazione di dette nanoparticelle.

20 Gli inventori hanno dimostrato (dati riportati nella sezione sperimentale) che, rispetto ai più diffusi reagenti per la trasfezione cellulare esistenti sul mercato (Lipofectamine, Lipofectamine 2000, Lipofectamine Plus) le nanoparticelle lipidiche a multicomponenti oggetto della presente invenzione evidenziano numerosi vantaggi relativamente ai problemi indicati sopra. I principali vantaggi sono i seguenti:

- 25 (i) Le nanoparticelle hanno dimensioni controllate ed estremamente monodisperse;
- (ii) La carica superficiale delle nanoparticelle è positiva ed estremamente riproducibile;
- (iii) L'internalizzazione cellulare è veloce ed estremamente efficace;
- 30 (iv) Il rilascio citoplasmatico del carico genetico è completo;

(v) Il materiale genetico rilasciato entra efficacemente nel nucleo;

(vi) L'efficienza di trasfezione della nanoparticelle è superiore a quella dei reagenti comunemente utilizzati nella lipotrasfezione (come Lipofectamine, Lipofectamine 2000, Lipofectamine Plus) ( $\approx 10^{10}$  RLU/mg proteina) in diverse linee cellulari (NIH 3T3; HeLa; CHO; A17).

(vii) Le nanoparticelle non sono tossiche (vitalità cellulare > 70%).

#### GLOSSARIO

Per Nanoparticelle lipidiche ai fini della presente invenzione s'intendono particelle costituite da un nucleo di acidi nucleici rivestito da uno o più strati lipidici (guscio lipidico) idonee all'uso in terapia genica.

Con il termine agente condensante gli acidi nucleici s'intendono molecole a carica positiva comunemente note per la loro capacità di fare condensare gli acidi nucleici, dotati di carica positiva, a questa categoria appartengono diverse classi di sostanze note in letteratura come descritto nello stato della tecnica.

Per Lipidi ai fini della presente invenzione s'intendono sia lipidi come comunemente intesi nei dizionari scientifici, sia loro derivati come ad esempio derivati del colesterolo e fosfolipidi.

Come acidi nucleici s'intendono: dsDNA (double strand DNA), ssDNA (single strand DNA), RNA, siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), mRNA, dsRNA (double strand RNA), tRNA, miRNA (microRNA) o una loro miscela. Tali acidi nucleici potranno essere a singolo e/o doppio filamento, sotto forma di vettori integrabili nel genoma, trasponibili, minicromosomi (ovvero dotati di centromero e telomeri o più in generale, di elementi che ne consentano una replicazione autonoma), provvisti di un'origine di replicazione eccetera.

Per trasporto genico s'intendono quelle metodologie che permettono di trasferire un acido nucleico esogeno all'interno di una cellula allo scopo di alterarne

transitoriamente o permanentemente il fenotipo come ad esempio tecniche di trasfezione che permettono di esprimere o silenziare specifici geni nelle cellule trasformate.

- 5 Il termine silenziamento genico è utilizzato nella presente descrizione in accordo con lo stato della tecnica.

Per terapia genica s'intende l'inserzione di materiale genetico come sopra definito (acidi nucleici) all'interno di cellule al fine di poter curare delle patologie. Questa  
10 procedura d'inserzione, nota come trasfezione, permette di trasferire uno o più geni sani in una cellula malata, al fine di curare una patologia causata dall'assenza o dal difetto di uno o più geni (mutati) o di uno o più acidi nucleici in grado di silenziare geni che sono sovra espressi o espressi nella cellula malata.

- 15 L'acronimo DOTAP indica il lipide cationico 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano.  
L'acronimo DC-Chol indica il lipide cationico derivato del colesterolo 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato.  
L'acronimo DOPE indica il fosfolipide dioleoilfosfatidiletanolamina.  
L'acronimo DOPC indica il fosfolipide dioleilfosfocolina.

20

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLE FIGURE

La figura 1 mostra in 1(A) l'efficienza di trasfezione nelle cellule ovariche CHO di diverse nanoparticelle secondo l'invenzione (sono indicati i rapporti relativi tra i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-  
25 dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) sotto ad ogni istogramma) e della Lipofectamine che è uno dei reagenti più comuni per la trasfezione cellulare. Gli istogrammi in grigio si riferiscono ad esperimenti effettuati utilizzando 5 µg di campione (per campione s'intende la soluzione di liposomi cationici  
30 descritti al punto f. del metodo sopra) per pozzetto, quelli in nero utilizzando 10 µg di

campione per pozzetto. In 1 (B) la figura mostra l'efficienza di trasfezione nei fibroblasti NIH 3T3 di diverse nanoparticelle secondo l'invenzione (sono indicati i rapporti relativi tra i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) sotto ad ogni istogramma) e della Lipofectamine. Gli istogrammi in grigio si riferiscono ad esperimenti effettuati utilizzando 5 µg di campione per pozzetto, quelli in nero utilizzando 10 µg di campione per pozzetto.

10 La figura 2 mostra i risultati di un saggio di vitalità cellulare condotto sulle cellule ovariche CHO come descritto nella sezione sperimentale (sono indicati i rapporti relativi tra i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) sotto ad ogni istogramma).

La figura 3 mostra sovrapposizioni rappresentative di immagini di fluorescenza e immagini Nomarski nelle cellule CHO. Il segnale bianco è dovuto alla presenza del DNA fluorescente.

20

Per ogni immagine è stato effettuato uno scan lungo l'asse z. Come si vede nelle due immagini rappresentative, il DNA è uniformemente diffuso nel citoplasma e nel nucleo della cellula. Rispetto a quanto che si osserva con i più diffusi reagenti per la trasfezione a base lipidica, non sono visibili aggregati perinucleari con DNA confinato.

25

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda dunque nano particelle lipidiche multicomponente consistente in un nucleo costituito da una o più molecole di acido nucleico e da uno o più agenti condensanti di acidi nucleici e un rivestimento esterno

costituito dai lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e dai fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfoliina (DOPC).

Secondo la presente invenzione, poiché la nanoparticella deve essere idonea all'uso in  
5 terapia genica, le molecole di acido nucleico possono essere scelte tra dsDNA (double strand DNA), ssDNA (single strand DNA) ovvero DNA a doppio o singolo filamento, RNA, siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), mRNA, dsRNA (double strand RNA), tRNA, miRNA (microRNA) o una loro miscela.

Le molecole di acido nucleico potranno essere inserite in opportuni vettori che ne  
10 permettano l'incorporazione nel genoma ospite (ad esempio vettori trasponibili) o che ne permettano la replicazione e l'espressione o la trascrizione nella cellula ospite (cellula eucariote), come ad esempio opportuni vettori di clonaggio, vettori di espressione, minicromosomi eccetera. Gli acidi nucleici (anche definiti qui come "materiale genetico" in generale) potranno essere geni per terapia genica sostitutiva  
15 (cioè per terapia genica in cui la malattia è causata da una mancata espressione di un determinato gene o in cui è espresso un gene non funzionale) o potranno essere sequenze volte ad interferire con l'espressione di uno o più geni espressi o sovra espressi nelle cellule malate, come ad esempio nelle cellule tumorali, e normalmente non espressi nelle cellule sane. Il materiale genetico inserito potrà anche consistere di  
20 tRNA laddove la disfunzione sia legata all'assenza o al mal funzionamento di un particolare tRNA.

Tali acidi nucleici sono definiti anche nella presente descrizione come "sequenze di  
interesse" poiché nella realizzazione dell'invenzione come qui insegnata non è rilevante, ai fini dell'ottenimento di una particella avente i vantaggi tecnici sopra  
25 elencati, quali sequenze siano inserite nel nucleo acidi nucleici/agente condensante di acidi nucleici, qualsiasi sequenza potrà essere inserita senza che cambino le caratteristiche chimico-fisiche delle nano particelle.

È evidente che nella forma di realizzazione preferita tali sequenze avranno una funzione riconosciuta nella terapia genica.

30 Il tecnico del settore saprà "caricare" le nanoparticelle dell'invenzione con gli acidi

nucleici idonei all'obiettivo medico da perseguire senza bisogno di ulteriori insegnamenti nella presente descrizione che fornisce efficaci "mezzi di trasporto" per tali acidi nucleici e procedimenti dettagliati per realizzarli.

Il rapporto tra il volume di dette una o più molecole di acido nucleico e di detti agenti condensanti di acidi nucleici nelle nano particelle secondo l'invenzione potrà essere  
5 compreso tra circa 1:1 e circa 1:0,5, in una forma di realizzazione tale rapporto sarà di circa 1:0,75.

Per la realizzazione della presente invenzione potranno essere utilizzati uno o più condensanti di acidi nucleici comunemente noti nel settore. Ad esempio, tali agenti  
10 potranno essere scelti tra poliammine (ad esempio spermina o spermidina) , peptidi cationici (esempio?), lipidi cationici (esempio?), tensioattivi cationici (esempio?), aminoacidi a carica positiva (ad esempio arginina e lisina), proteine a carica positiva, cationi metallici multivalenti (ad esempio  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ).

Gli esempi sopra indicati non sono limitativi della realizzazione dell'invenzione ma  
15 hanno lo scopo di fornire al lettore della presente invenzione esempi concreti di molecole idonee tra quelle note al tecnico del settore.

In una particolare forma di realizzazione il nucleo della nanoparticella sarà realizzato utilizzando come condensante la protamina.

In questa forma di realizzazione il nucleo avrà un diametro idrodinamico,  $D = 230 \pm 18$   
20 nm; e una carica superficiale =  $- 19.5 \pm 2.5$  mV.

Per quanto riguarda il guscio esterno della nanoparticella, i lipidi cationici e i fosfolipidi potranno essere in rapporti reciproci variabili, secondo alcune forme di realizzazione detti lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-  
25 dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e detti fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfoliina (DOPC) saranno presenti in un rapporto reciproco scelto tra 1,5:0,5:1,5:0,5 o 1:1:1:1 o 0,5:1,5:0,5:1,5.

In una particolare forma di realizzazione il rapporto reciproco sopra menzionato sarà 0,5:1,5:0,5:1,5.

Nella realizzazione della presente invenzione, data la scelta dei lipidi di rivestimento, la  
30 carica superficiale della nanoparticella è positiva e, nella forma di realizzazione in cui il

rapporto reciproco tra detti lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e detti fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) è 0,5:1,5:0,5:1,5. la carica superficiale della nanoparticella avrà un potenziale z compreso tra circa 40 e 45 mV, un esempio non limitativo è rappresentato da un potenziale z di circa + 42mV.

La nanoparticella lipidica realizzata come qui descritto, avrà diametro compreso tra 200 e 250 nm e potrà avere un indice di polidispersità <0,2.

Nella forma di realizzazione in cui il rapporto reciproco tra detti lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e detti fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) è 0,5:1,5:0,5:1,5 il diametro D della particella sarà di circa  $210 \pm 12$  nm e l'indice di polidispersità sarà <0,2.

Le suddette nanoparticelle presentano le seguenti caratteristiche

- (i) Le nanoparticelle hanno dimensioni controllate ed estremamente monodisperse (indice di polidispersità < 0.2)
- (ii) Hanno una carica superficiale positiva e estremamente riproducibile;
- (iii) L'internalizzazione cellulare è veloce ed estremamente efficace;
- (iv) Il rilascio citoplasmatico del carico genetico è completo;
- (v) Il materiale genetico rilasciato entra efficacemente nel nucleo;
- (vi) L'efficienza di trasfezione della nanoparticelle è superiore a quella dei reagenti comunemente utilizzati per la lipotrasfezione, come le lipofectamine ( $\approx 10^{10}$  RLU/mg proteina) in diverse linee cellulari (NIH 3T3; HeLa; CHO; A17).
- (vii) Le nanoparticelle non sono tossiche (vitalità cellulare > 70%).

La presente invenzione riguarda anche un procedimento per la preparazione di nanoparticelle lipidiche multicomponente comprendente i seguenti passaggi:

- a. molecole di acidi nucleici ed un insieme di uno o più agenti condensanti gli acidi nucleici sono sciolti separatamente ad uguale concentrazione in H<sub>2</sub>O distillata

- e sono quindi miscelati tra loro ad un rapporto compreso tra 1:1 e 1:0,5 ottenendo così un complesso carico negativamente (Per lieve agitazione);
- b. un volume desiderato del complesso ottenuto al punto a. è lasciato equilibrare per un periodo compreso tra 30 e 180 minuti a temperatura ambiente;
- 5 c. si preparano liposomi cationici multicomponente sciogliendo individualmente i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfoliina (DOPC) in un opportuno solvente organico e si miscelano quantità desiderate di ciascun
- 10 lipide così sciolto fino ad ottenere una miscela omogenea;
- d. si rimuove completamente il solvente organico dalla miscela ottenuta al punto c. ottenendo così un film lipidico;
- e. il film lipidico ottenuto al punto d. è idratato con un opportuno tampone a pH fisiologico cellulare fino ad ottenere una concentrazione finale desiderata;
- 15 f. la soluzione lipidica ottenuta al punto e. è sonicata fino ad ottenere una soluzione limpida (che indica la formazione delle vescicole uni lamellari);
- g. il complesso equilibrato ottenuto al punto b. è fatto interagire con un opportuno volume della soluzione ottenuta al punto f. ad un rapporto di carica rho mole di lipide cationico/base di acido nucleico compreso tra circa 2 e 3, estremi inclusi, ed
- 20 è incubato a circa 37°C fino a formazione delle nanoparticelle.

Nel procedimento qui descritto, la concentrazione della soluzione di acidi nucleici e della soluzione contenente l'agente o gli agenti condensanti gli acidi nucleici potranno avere una concentrazione scelta secondo le necessità dell'operatore, tale

25 concentrazione, che sarà uguale per le due diverse soluzioni, potrà essere tra 0,5 e 1,5 mg/ml ad esempio, e cioè circa 0,5; circa 0,6; circa 0,7; circa 0,8; circa 0,9; circa 1; circa 1,1; circa 1,2; circa 1,3; circa 1,4; circa 1,5 mg/ml a titolo esemplificativo anche se la presente invenzione non esclude che il tecnico del settore possa selezionare concentrazioni diverse.

30 Il rapporto di volume tra la soluzione di acidi nucleici e la soluzione di agente

condensante gli acidi nucleici al punto a. sarà, come descritto, in un intervallo tra 1:1 e 0,5:1. A titolo esemplificativo e non limitativo, tale rapporto potrà essere, nell'ordine sopra indicato (volume della soluzione di acidi nucleici: volume della soluzione di agenti condensanti gli acidi nucleici) circa 0,5:1; 0,55:1; 0,6:1; 0,65:1; 0,7:1; 0,75:1; 5 0,8:1; 0,85:1; 0,9:1; 0,95:1; 1:1.

Le molecole di acidi nucleici che possono essere utilizzate per la preparazione del nucleo delle nanoparticelle dell'invenzione sono quelle indicate precedentemente nella parte relativa alla descrizione delle nanoparticelle stesse e potranno quindi essere scelte tra DNA, RNA, siRNA, shRNA, mRNA; miRNA; dsRNA.

10

Nel procedimento sopra descritto, gli agenti condensanti di acidi nucleici sono scelti tra poliammine, peptidi cationici, lipidi cationici, tensioattivi cationici, amminoacidi a carica positiva, proteine a carica positiva, cationi metallici multivalenti. Esempi non limitativi di molecole idonee sono qui forniti nella parte relativa alla descrizione delle nanoparticelle 15 stesse e potranno quindi essere: per le poliammine scelte tra spermina e spermidina, per gli amminoacidi a carica positiva scelti tra arginina e lisina, per le proteine a carica positiva scelte tra protamina e istoni, per i cationi metallici multivalenti scelti tra  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ;  $Fe^{2+}$ ;  $Fe^{3+}$ .

In una particolare forma di realizzazione è scelta, come agente condensante di acidi 20 nucleici, la protamina.

Nel procedimento sopra descritto, si lascia equilibrare un volume desiderato del complesso ottenuto in a. (che corrisponderà al "nucleo" delle nanoparticelle), per un periodo compreso tra 30 e 180 minuti circa, questo periodo potrà essere, ad esempio di 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 minuti circa.

25 In generale è sufficiente anche un periodo compreso tra circa 30 e 60 minuti circa, estremi inclusi.

I nuclei così ottenuti possono essere conservati per un periodo da qualche ora a circa 24 ore a circa +4°C.

Poiché il nucleo ottenuto in b. contenendo acidi nucleici, è più delicato rispetto alle 30 vescicole unilamellari ottenute al punto f., che possono essere conservate in frigorifero

(a circa +4°C) per circa una settimana o due, è consigliabile preparare prima le vescicole o comunque preparare il nucleo e le vescicole contemporaneamente in modo da utilizzare il nucleo ottenuto in b. il prima possibile ed evitare possibili degradazioni dello stesso al fine di ottenere nanoparticelle multicomponente con la  
5 maggiore efficacia.

Nel procedimento descritto, per la preparazione delle vescicole da utilizzare per il realizzare il rivestimento del nucleo, si utilizzeranno i lipidi (cationici e fosfolipidi) sopra indicati, nei rapporti reciproci desiderati. Si è visto che i vari rapporti saggiati sono tutti efficaci per realizzare vescicole con buone proprietà di trasfezione e bassa tossicità.

10 In particolare, al punto c. potranno essere miscelati i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfolina (DOPC) in un rapporto reciproco scelto tra 1,5:0,5:1,5:0,5 o 1:1:1:1 o 0,5:1,5:0,5:1,5.

15 In una forma di realizzazione particolarmente interessante, i suddetti lipidi potranno essere miscelati, e quindi presenti nel rivestimento del nucleo acido nucleico/condensante delle nanoparticelle qui descritte, nel rapporto reciproco (in cui l'ordine dei lipidi è quello indicato nel paragrafo precedente) 0,5:1,5:0,5:1,5.

Ciascun lipide sarà sciolto in un solvente organico opportuno e quindi mescolato nei  
20 rapporti desiderati o indicati sopra.

Qualsiasi solvente organico idoneo potrà essere utilizzato, ad esempio, solventi organici idonei, comunemente utilizzati dal tecnico del settore, potranno essere cloroformio o etanolo.

I reagenti saranno miscelati fino ad ottenere una soluzione omogenea, a temperatura  
25 ambiente per un periodo compreso tra 1 e 5 minuti, come ad esempio circa 1-2 minuti.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, I liposomi cationici a multicomponente costituiti dalle quattro specie lipidiche che si ottengono al punto f. si possono preparare ad una frazione molare di lipide neutro nel doppio strato  $\Phi = (\text{lipide neutro} / \text{lipide totale})$  (mol/mol) = tra 0.4 e 0.6, ad esempio 0.5. I lipidi si sciolgono nell'opportuno  
30 solvente, ad esempio cloroformio, e si mescolano fino ad ottenere un miscelamento

omogeneo delle quattro specie lipidiche (in solvente organico il miscelamento di molecole lipidiche è un miscelamento omogeneo). La quantità di solvente da utilizzare dipende dalla solubilità delle specie lipidiche utilizzate, ad esempio, le soluzioni si possono preparare a circa 10/20 mg lipide/ml cloroformio.

5 Il solvente organico è quindi rimosso al punto d., ciò può essere realizzato con qualsiasi opportuno mezzo noto al tecnico del settore, come ad esempio utilizzando un evaporatore rotante convenzionale. Tale procedura porta alla formazione di un sottile film lipidico sul fondo del recipiente utilizzato. La rimozione del solvente organico deve essere completa, per assicurare la completa rimozione del solvente organico, il film  
10 lipidico può essere ad esempio tenuto per 24 ore sotto vuoto.

Successivamente, il film lipidico al punto d. è idratato con un opportuno tampone a pH fisiologico cellulare fino ad ottenere una concentrazione finale desiderata.

Qualsiasi tampone comunemente idoneo all'uso con cellule vitali, che stabilizzi il pH a livelli fisiologici, come ad esempio il tampone Tris-HCl a pH fisiologico potrà esser  
15 utilizzato.

Ad esempio potrà essere utilizzato Tris-HCl (10 mM, pH 7.4) necessario ad ottenere una concentrazione finale di 1 mg/ml.

A questo punto, la soluzione lipidica ottenuta al punto e. sarà sonicata fino ad ottenere una soluzione limpida, la chiarificazione della soluzione indica la formazione di  
20 vescicole lamellari costituite dai lipidi suddetti nei rapporti selezionati dall'operatore, che saranno utilizzate per rivestire il nucleo formato al punto b.

Potrà essere utilizzato qualsiasi sonicatore idoneo convenzionalmente utilizzato dal tecnico del settore, come ad esempio un sonicatore con punta al titanio per un periodo di circa 10 minuti. Il tecnico del settore saprà scegliere la sequenza di cicli on -off più  
25 efficace senza bisogno di ulteriori insegnamenti. A titolo meramente esemplificativo e non limitativo potrà essere utilizzata una sequenza di cicli 8 s on - 6 s off per t=10 min.

Le vescicole così preparate potranno essere conservate a circa +4°C per un periodo fino a 1 o 2 settimane, e potranno essere poi direttamente utilizzate per il passaggio f. del procedimento di preparazione delle nanoparticelle dell'invenzione.

30 In questo passaggio si mescola un opportuno volume di dette vescicole con un

opportuno volume del complesso equilibrato ottenuto al punto b. (in una forma esemplificativa, ovviamente non limitativa dell'invenzione, si possono mescolare circa 5 microlitri di vescicole con 2 microlitri di condensante/acido nucleico) ad un rapporto di carica (moli di lipide cationico/basi di acido nucleico  $\rho$  compreso tra circa 2 e 3, estremi inclusi. Tale rapporto, in una forma esemplificativa non limitativa, potrà essere ad esempio circa 2,5.

Il calcolo del rapporto di carica  $\rho$  può essere fatta come segue (l'esempio si riferisce ad una forma di realizzazione in cui l'acido nucleico è DNA):

il numero di moli di lipide cationico è dato dal calcolo:

10 massa lipide cationico/peso molecolare del lipide cationico;

il numero di nucleotidi è dato dal calcolo:

massa di DNA/324.5 (peso molecolare di un nucleotide che contiene una carica negativa).

Da qui,  $\rho = \text{Numero di moli di lipide cationico} / \text{Numero di nucleotidi (o di basi)}$ .

15 L'incubazione potrà essere effettuata per un periodo compreso tra circa 30 minuti e 3 ore, ad esempio un periodo di 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 minuti circa.

In una forma di realizzazione molto efficace sono preparate nanoparticelle multicomponente in cui il nucleo è formato da acido nucleico e protamina in rapporto di volume acido nucleico/protamina pari a circa 1:0,5 partendo da soluzioni iniziali aventi una concentrazione  $c=1$  mg/ml. Il nucleo si presenta dimensioni con diametro  $D=230 \pm 18$  nm e carica superficiale  $= -19,5 \pm 2,5$  mV.

20 Le soluzioni di DOTAP, DC-Chol, DOPE e DOPC sono preparate in cloroformio ad una frazione molare di lipide neutro nel doppio strato  $\Phi = (\text{lipide neutro} / \text{lipide totale})$  (mol/mol) pari a 0,5 e il rapporto reciproco in cui sono miscelate al punto c. (nell'ordine sopra indicato) è scelto tra

- DOTAP-DC-Chol-DOPC-DOPE (1.5:0.5:1.5:0.5)
- DOTAP-DC-Chol-DOPC-DOPE (1:1:1:1)
- DOTAP-DC-Chol-DOPC-DOPE (0.5:1.5:0.5:1.5).

30 La soluzione contenente il nucleo e quella contenente le vescicole multicomponente

ottenute come sopra descritto sono miscelate in modo tale che il rapporto di carica (mole di lipide cationico/base di acido nucleico sia pari a circa 2,5.

Le nanoparticelle ottenute presentano la composizione in lipidi nel rivestimento con rapporti reciproci pari a quelli utilizzati nel passaggio di miscelazione c.

- 5 Sono ovviamente anche oggetto dell'invenzione le nanoparticelle definite come "nanoparticelle ottenibili mediante il procedimento dell'invenzione come definito nella descrizione e nelle rivendicazioni relative detto procedimento".

Come già indicato, sono oggetto della presente invenzione le nanoparticelle come qui descritte per uso nella terapia genica.

- 10 In altri termini, è oggetto dell'invenzione un metodo di terapia genica che comprende il passaggio di somministrare ad un paziente che ne abbia bisogno, le nanoparticelle dell'invenzione.

E' evidente che le nanoparticelle saranno realizzate con gli opportuni acidi nucleici selezionati in relazione alla terapia genica desiderata.

- 15 Senza legarsi a specifiche teorie, gli inventori della presente invenzione hanno formulato le seguenti ipotesi.

- Le interazioni elettrostatiche non sono sufficienti a descrivere la formazione e la stabilità termodinamica del nucleo DNA/agente condensante, ma è necessario riferirsi al meccanismo del rilascio dei contro-ioni. La condensazione di Poisson-Boltzman  
20 prevede che le macromolecole cariche siano circondate in soluzione da uno strato diffuso di contro-ioni. Sotto formazione del complesso, le macromolecole rilasciano i propri contro-ioni in soluzione con un notevole guadagno entropico del sistema(circa 1 KT per ogni contro-ione rilasciato). Lo stesso meccanismo d'azione è in grado di giustificare la formazione della nanoparticella. L'aspetto più significativo è la  
25 straordinaria capacità esibita dalle nanoparticelle lipidiche a multicomponenti di rilasciare il DNA nel citoplasma e nel nucleo della cellula (vedi Figura 3). Questa proprietà rende uniche le nanoparticelle lipidiche a multicomponenti ed è la spiegazione più probabile della loro elevata efficienza (Figura 1). Questa intrinseca capacità di uscire dagli endosomi e rilasciare il DNA è probabilmente dovuta, tra gli  
30 altri fattori, al numero delle specie lipidiche coinvolte che sono in grado di

massimizzare l'entropia di mescolamento lipidico (lipid mixing) rendendo energeticamente favorito il mescolamento con le specie lipidiche delle membrane endosomiali (Caracciolo et al. The Journal of Physical Chemistry B 110, 20829-20835 (2006)). Questo mescolamento sembra essere necessario per la formazione degli intermedi strutturali che conducono alla fusione del doppio strato lipidico della nanoparticelle e quello delle membrane degli endosomi. In più, il ridotto numero di strati del guscio lipidico rispetto ai lipoplessi di stessa composizione è compatibile con un più semplice disassemblaggio delle nanoparticelle rispetto ai lipoplessi multilamellari.

I seguenti esempi hanno lo scopo di illustrare, senza tuttavia limitarla al loro contenuto, l'invenzione in modo da fornire al tecnico del settore esempi concreti di realizzazione dell'invenzione.

#### ESEMPI e PARTE SPERIMENTALE

Gli esperimenti di trasfezione sotto riportati sono stati realizzati su linee cellulari commerciali e

NIH 3T3 Numero ATCC CRL-1658

HeLa Numero ATCC CCL-2

CHO (Numero ATCC CCL-61)

Su cellule murine qui denominate A17 isolate dagli inventori.

### **1. PROCEDURA DI PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE LIPIDICHE**

Le nanoparticelle sono costituite da un nucleo di DNA/protamina ottenuto mescolando due soluzioni di DNA e protamina in rapporto di volume DNA/protamina 1:0.75 (le soluzioni di partenza di DNA e protamina hanno la stessa concentrazione,  $c=1$  mg/ml). Il guscio DNA/protamina è lasciato equilibrare per un'ora a temperatura ambiente. Al termine di questa procedura il guscio DNA/protamina è carico negativamente (Potenziale Zeta =  $-19.5 \pm 2.5$  mV) ed ha dimensioni caratteristiche pari circa a 230 nm (diametro idrodinamico,  $D = 230 \pm 18$  nm). Un volume complesso DNA/protamina così

preparato è fatto interagire per 20 minuti con una soluzione di liposomi cationici costituiti da una miscela del lipide cationico commerciale DOTAP, del derivato cationico del colesterolo DC-Chol e da due fosfolipidi neutri come DOPE e DOPC. Le quattro specie molecolari sono mescolate in rapporto 0.5:1.5:0.5:1.5. Dopo 2 ore di incubazione, la formazione delle nanoparticelle è completa. La carica superficiale è positiva con il nucleo di DNA/protamina è ricoperto da un guscio lipidico costituito da una ad alcuni doppi-strati lipidici. La formulazione lipidica utilizzata nella presente invenzione non è mai stata precedentemente impiegata per la produzione di nanoparticelle con un nucleo di DNA/protamina.

10

## **2. PROCEDIMENTO DETTAGLIATO DI PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE UTILIZZATE NEGLI ESPERIMENTI RIPORTATI NELLE FIGURE**

I lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP) e  $3\beta$ -[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i due fosfolipidi neutri dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) sono stati acquistati dalla Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) ed utilizzati senza ulteriori purificazioni. Per le misure di microscopia di fluorescenza sono stati utilizzati i lipidi neutri fluorescenti DOPC-NBD e DOPE-NBD acquistati dalla Avanti Polar Lipids. I liposomi cationici a multicomponente costituiti dalle quattro specie lipidiche sono stati preparati ad una frazione molare di lipide neutro nel doppio strato  $\Phi = (\text{lipide neutro} / \text{lipide totale}) (\text{mol/mol}) = 0.5$ . I lipidi sono stati sciolti in cloroformio e mescolati in modo da ottenere un miscelamento omogeneo delle quattro specie lipidiche. La quantità di cloroformio da utilizzare dipende dalla solubilità delle specie lipidiche utilizzate, in genere le soluzioni sono state preparate a circa 10/20 mg lipide/ml cloroformio. Il solvente organico è stato rimosso utilizzando un evaporatore rotante che ha portato alla formazione di un sottile film lipidico sul fondo di un'ampolla. Per assicurare la completa rimozione del solvente organico, il film lipidico è stato tenuto per 24 ore sotto vuoto. Successivamente il film lipidico è stato idratato aggiungendo il volume di tampone Tris-HCl (10 mM, pH 7.4) necessario ad ottenere una

30

concentrazione finale di 1 mg/ml. Per ottenere vescicole unilamellari, le soluzioni lipidiche sono state sonicate utilizzando un sonicatore a punta al titanio con una sequenza di cicli (8 s on - 6 s off) per t=10 min. Le soluzioni lipidiche utilizzate sono state preparate facendo variare il rapporto tra le specie lipidiche cationiche:

5

- DOTAP-DC-Chol-DOPC-DOPE (1.5:0.5:1.5:0.5)
- DOTAP-DC-Chol-DOPC-DOPE (1:1:1:1)
- DOTAP-DC-Chol-DOPC-DOPE (0.5:1.5:0.5:1.5)

10 Il DNA a doppio filamento di timo di vitello è stato acquistato dalla Sigma (St. Louis, MO) ed utilizzato senza ulteriori purificazioni. E' stato sciolto in acqua distillata ad una concentrazione di 1 mg/ml e sonicato con un sonicatore a punta (t=5 min., 8 s on - 6 s off) per ottenere una soluzione omogenea in lunghezza (lunghezza del DNA dalle 500 alle 1000 coppie di basi). Il DNA lineare è stato utilizzato per tutti gli esperimenti di  
15 caratterizzazione chimico-fisica delle nanoparticelle.

Per gli esperimenti di trasfezione cellulare è stato utilizzato il DNA plasmidico (pGL3 che codifica per la luciferasi) acquistato dalla Promega (Madison, WI) e sciolto in acqua bidistillata (Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia) ad una concentrazione di 1 mg/ml. Per gli esperimenti di microscopia di fluorescenza è stato utilizzato il DNA  
20 plasmidico 2.7-kbp marcato con Cy3 (Mirus Bio Corporation, Madison, WI).

La protamina solfato di salmone (MW = 5.1 kDa), acquistata dalla Sigma, è stata sciolta in acqua distillata ad una concentrazione di 1 mg/ml. Il nucleo delle nanoparticelle è stato ottenuto mescolando il DNA (lineare, plasmidico e fluorescente) e la soluzione di protamina ad un rapporto di volume 1:0.75 al fine di ottenere un  
25 complesso carico negativamente. Un volume desiderato di DNA/protamina è lasciato equilibrare per un'ora a temperatura ambiente e successivamente è stato fatto interagire con un opportuno volume della soluzione di liposomi cationici ad un rapporto di carica  $\rho$  (mole di lipide cationico/base del DNA) = 2.5. Dopo 2 ore di incubazione, la formazione delle nanoparticelle è completa.

30

**3. Protocollo per un esperimento di trasfezione (condizioni riferite ad un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti)\***

1. 0,5 microlitri di DNA (concentrazione 1 mg/ml) sono mescolati con 0.35 microlitri di protamina (concentrazione 1 mg/ml) e lasciati incubare per 10 minuti.
- 5 2. Sono aggiunti 49.1 microlitri di Opti-MEM® (Life Technologies) al complesso DNA/protamina formato.
3. 5 microlitri della soluzione di liposomi cationici sono diluiti in 45 microlitri di Opti-MEM®.
4. 50 microlitri della soluzione DNA/protamina sono mescolati con 50 microlitri  
10 della soluzione di liposomi cationici. Le nanoparticelle così formate sono lasciate incubare per 2 ore a temperatura ambiente.
5. 100 microlitri della soluzione di nanoparticelle sono diluiti in 400 microlitri di Opti-MEM® (volume di 500 x pozzetto) e dati ad un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti (cellule al 70% di confluenza).
- 15 6. Dopo 4 ore, i 500 microlitri sono rimossi dal pozzetto e è aggiunto 1 ml di terreno di coltura (DMEM) complementato con siero.

\* In questo caso il rapporto di carica delle nanoparticelle è  $\rho=2.5$ . Per raddoppiare il rapporto di carica è necessario utilizzare 10 microlitri della soluzione di liposomi cationici (punto 3).

20

**4. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI TRASFEZIONE (FIGURA 3)**

**QUANTIFICAZIONE DELL'ATRASFEZIONE**

I dati relativi all'efficienza di trasfezione sono riportati in figura 1 come istogramma e  
25 nella figura 3 come immagini di fluorescenza.

**a. Prelievo dei lisati cellulari**

48 ore dopo la trasfezione sono stati prelevati i lisati cellulari da utilizzare per l'analisi al luminometro e allo spettrofotometro. In ogni pozzetto della piastra di coltura:

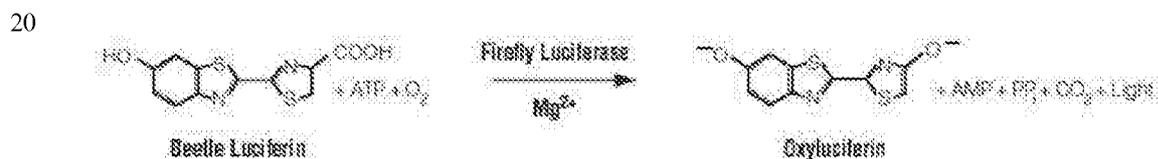
- è stato aspirato il terreno ed effettuato un lavaggio con PBS a temperatura ambiente  
30 (1 ml/pozzetto);
- sono stati aggiunti 200 microlitri di tampone di lisi 'Lysis Buffer' (Promega) e il lisato

cellulare è stato recuperato e trasferito in una eppendorf opportunamente contrassegnata e mantenuta in ghiaccio.

A questo punto ogni provetta è stata mescolata con vortex (10 secondi circa) e centrifugata (2 minuti, 12000 g, 4° C); il sovranatante è stato poi aliquotato in due nuovi tubi e conservato a - 80° C.

### b. Letture al luminometro

Per l'analisi quantitativa dell'attività della luciferasi, quale indice dell'efficienza di trasfezione, i lisati delle cellule sono stati saggati al luminometro (Berthold AutoLumat luminometer LB-953). A tale scopo, a 20 microlitri di ciascun campione sono stati aggiunti 100 microlitri di substrato (luciferina) e subito letti per 10 secondi (2 sec di delay), seguendo il protocollo allegato al kit Promega's Luciferase Assay System. La reazione che avviene prevede la conversione in luce dell'energia chimica liberata dall'ossidazione della luciferina in ossiluciferina, catalizzata dalla luciferasi. L'intensità di luce, rimanendo costante per almeno un minuto, è acquisita come valore numerico che corrisponde all'area sottesa alla curva di emissione nell'intervallo di tempo impostato. Ogni campione è stato misurato in doppio. Per normalizzare i valori ottenuti rispetto alle proteine totali presenti nei lisati, poi, gli stessi campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro.



Reazione bioluminescente catalizzata dalla luciferasi di lucciola (Firefly Luciferase).

### Letture allo Spettrofotometro

Le letture al luminometro sono state normalizzate per i milligrammi di proteine cellulari totali presenti nei lisati, usando il Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad), secondo il metodo di Bradford.

Allo scopo di ottenere dei valori di riferimento con cui confrontare i dati sperimentali, è stata costruita una curva di taratura, partendo da una soluzione madre di BSA (SieroAlbumina Bovina) a concentrazione nota (2 mg/ml) e diluendo 100 microlitri di quest'ultima in 2 ml finali di H<sub>2</sub>O. Sono state quindi saggate due serie da 6 cuvette contenenti quantità scalari di BSA, H<sub>2</sub>O e Bio-Rad:

- 800 microlitri H<sub>2</sub>O + 200 microlitri Bio-Rad

- 20 microlitri BSA + 780 microlitri H<sub>2</sub>O + 200 microlitri Bio-Rad
- 50 microlitri BSA + 750 microlitri H<sub>2</sub>O + 200 microlitri Bio-Rad
- 100 microlitri BSA + 700 microlitri H<sub>2</sub>O + 200 microlitri Bio-Rad
- 150 microlitri BSA + 650 microlitri H<sub>2</sub>O + 200 microlitri Bio-Rad
- 5 - 200 microlitri BSA + 600 microlitri H<sub>2</sub>O + 200 microlitri Bio-Rad

Tracciata la curva, dunque, sono state predisposte per la lettura due cuvette per ciascun lisato di cellule trasfettate, contenenti:

- 5 microlitri di campione
- 795 microlitri di H<sub>2</sub>O
- 10 - 200 microlitri di Bio-Rad

Subito prima della lettura a 595 nm il contenuto di ogni cuvetta deve essere agitato con vortex e lasciato al buio, per un tempo compreso tra i 5 ed i 60 minuti.

### **Analisi dei dati**

- 15 L'analisi statistica dei dati ottenuti dalle misurazioni è stata effettuata utilizzando il programma Microsoft Excel. I valori di Efficienza di Trasfezione TE (Relative Light Unità/mg proteina) sono stati calcolati come media di almeno quattro osservazioni sperimentali. Sugli stessi campioni sono state determinate anche la deviazione standard e il S.E.M. (Standard Error of the Mean).

20

### **5. VALUTAZIONE DELLA CITO-TOSSICITA'**

Un istogramma dei risultati ottenuti dal saggio sotto riportato è presentato in figura 2.

- Le cellule vive sono in grado di ridurre chimicamente il composto MTT (un sale di tetrazolio solubile in acqua) a sale di formazano insolubile in acqua e di color violetto
- 25 (Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63). Il test di tossicità delle nanoparticelle lipidiche multicomponente è stato eseguito su cellule ovariche CHO e 3T3 seminate su una piastra da 96 pozzetti (8000 cellule per pozzetto), in maniera tale da avere 16 pozzetti per condizione sperimentale. I
- 30 trattamenti sono stati effettuati in 100 microlitri di Optimem finali per pozzetto da 96: 80 microlitri di Optimem + 20 microlitri nanoparticelle lipidiche multicomponente (generate utilizzando 0,1 microgrammi di DNA per pozzetto e mantenendo gli stessi rapporti tra DNA e protamina e tra DNA/protamina e liposomi cationici descritti nel paragrafo 3: protocollo di trasfezione).

- 35 Dopo incubazione con le nanoparticelle (19 ore), al mezzo di coltura è aggiunto l'MTT

(concentrazione finale di 0,5 mg/ml) e la piastra è posta al buio a 37°C per 4 ore. Successivamente è eliminato dai pozzetti il terreno, aspirandolo delicatamente. Dopo essersi accertati che non siano rimaste tracce di soluzione nei pozzetti, si aggiungono 100 microlitri di DMSO a ciascuno di essi e si agita la piastra per 15 minuti a  
5 temperatura ambiente al buio allo scopo di sciogliere i cristalli del sale di formazano. Se le cellule sono vive e metabolicamente attive, effettuano la riduzione dell'MTT e quando è aggiunto il DMSO si osserva la formazione di un colore violetto. La vitalità è quantificata mediante lettura dell'assorbanza tramite un lettore di piastre ELISA, ad una lunghezza d'onda di 540 nm. I dati sono espressi come percentuale rispetto al  
10 controllo rappresentato da cellule non trattate con le miscele lipidiche.

#### BIBLIOGRAFIA

- Akita H., et al., Multi-layered nanoparticles for penetrating, Biomaterials 30 ( 2009),  
15 2940–2949.
- Caracciolo G. et al “Factors Determining the Superior Performance of Lipid/DNA/Protamine Nanoparticles over Lipoplexes” J. Med. Chem. 54 (12), pp 4160–4171(2011)
- Chang, H.; Yeh, M. “Clinical development of liposome-based drugs: formulation,  
20 characterization, and therapeutic efficacy”. Int. J. Nanomed. 2012, 7, 49-60”
- Elsabahy et al. “Non-Viral Nucleic Acid Delivery: Key Challenges and Future Directions”. Current Drug Delivery, 8, 2011, 235-244
- Pozzi D. et al “Programmed packaging of multicomponent envelope-type nanoparticle system for gene delivery”. Appl. Phys. Lett. 96, 183702 (2010); doi:  
25 10.1063/1.3427354

## RIVENDICAZIONI

1. Nanoparticella lipidica multicomponente consistente in un nucleo costituito da una o più molecole di acido nucleico e da uno o più agenti condensanti di acidi nucleici e un rivestimento esterno che consiste nei lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e dai fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfoliina (DOPC).  
5
  
2. Nanoparticella lipidica secondo la rivendicazione 1 in cui dette molecole di acido nucleico sono scelte tra dsDNA (double strand DNA), ssDNA (single strand DNA), RNA, siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), mRNA, dsRNA (double strand RNA), tRNA, miRNA (microRNA) o una loro miscela.  
10
  
3. Nanoparticella lipidica secondo la rivendicazione 2 in cui dette molecole di acido nucleico sono minicromosomi comprendenti sequenze di interesse, vettori di espressione comprendenti sequenze di interesse, elementi trasponibili comprendenti sequenze di interesse.  
15
  
4. Nanoparticella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui il rapporto tra il volume di dette una o più molecole di acido nucleico e detti agenti condensanti di acidi nucleici è di circa 1:0,75.  
20
  
5. Nanoparticella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui detti uno o più agenti condensanti di acidi nucleici sono scelti tra poliammine, peptidi cationici, lipidi cationici, tensioattivi cationici, amminoacidi a carica positiva, proteine a carica positiva, cationi metallici multivalenti.  
25
  
6. Nanoparticella lipidica secondo la rivendicazione 5 in cui dette poliammine sono scelte tra spermina e spermidina, detti amminoacidi a carica positiva sono scelti tra

arginina e lisina, dette proteine a carica positiva sono scelte tra protamina e istoni, detti cationi metallici multivalenti sono scelti tra  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ .

7. Nanoparticella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 in cui  
5 detto nucleo consiste in acido nucleico e protamina, avente un diametro idrodinamico,  $D = 230 \pm 18$  nm; e una carica superficiale =  $- 19.5 \pm 2.5$  mV.

8. Nanoparticella lipidica secondo la rivendicazione 7 in cui detti agenti condensanti di acid nucleici sono protamina.

10

9. Nanoparticella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 in cui  
detti lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-  
dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e detti fosfolipidi  
dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfoliina (DOPC) sono presenti in un  
15 rapporto reciproco scelto tra 1,5:0,5:1,5:0,5 o 1:1:1:1 o 0,5:1,5:0,5:1,5.

10. Nanoparticella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 in cui  
la carica superficiale di detta nanoparticella è positiva e ha un potenziale z di circa +  
42mV.

20

11. Nanoparticella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10  
avente un diametro compreso tra 200 e 250 nm ed un indice di polidispersità  $< 0,2$ .

12. Procedimento per la preparazione di nanoparticelle lipidiche multicomponente  
25 comprendente i seguenti passaggi:

a. molecole di acidi nucleici ed un insieme di uno o più agenti condensanti gli acidi  
nucleici sono sciolti separatamente ad uguale concentrazione in H<sub>2</sub>O distillata e  
sono quindi miscelati tra loro ad un rapporto compreso tra 1:1 e 1:0,5 ottenendo  
così un complesso carico negativamente (Per lieve agitazione);

30 b. un volume desiderato del complesso ottenuto al punto a. è lasciato equilibrare

- per un periodo compreso tra 30 e 180 minuti a temperatura ambiente;
- c. si preparano liposomi cationici multicomponente sciogliendo individualmente i lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e i fosfolipidi
- 5 dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) in un opportuno solvente organico e si miscelano quantità desiderate di ciascun lipide così sciolto fino ad ottenere una miscela omogenea;
- d. si rimuove completamente il solvente organico dalla miscela ottenuta al punto c. ottenendo così un film lipidico;
- 10 e. il film lipidico ottenuto al punto d. è idratato con un opportuno tampone a pH fisiologico cellulare fino ad ottenere una concentrazione finale desiderata;
- f. la soluzione lipidica ottenuta al punto e. è sonicata fino ad ottenere una soluzione limpida;
- g. il complesso equilibrato ottenuto al punto b. è fatto interagire con un opportuno
- 15 volume della soluzione ottenuta al punto f. ad un rapporto di carica rho mole di lipide cationico/base di acido nucleico compreso tra circa 2 e 3, estremi inclusi, ed è incubato a circa 37°C fino a formazione delle nanoparticelle.
- 20 13. Procedimento secondo la rivendicazione 12, in cui dette soluzioni di acido nucleico e di detto insieme di uno o più agenti condensanti gli acidi nucleici hanno una concentrazione di circa 1mg/ml.
14. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12 o 13, in cui detto
- 25 rapporto al punto a. è di circa 1:0,75.
15. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 14 in cui dette molecole di acido nucleico sono scelte tra dsDNA (double strand DNA), ssDNA (single strand DNA), RNA, siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), mRNA, dsRNA (double strand RNA), tRNA, miRNA (microRNA) o una loro miscela.
- 30

16. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 15 in cui detti uno o più agenti condensanti di acidi nucleici sono scelti tra poliammine, peptidi cationici, lipidi cationici, tensioattivi cationici, amminoacidi a carica positiva, proteine a carica positiva, cationi metallici multivalenti.
17. Procedimento secondo la rivendicazione 16 in cui dette poliammine sono scelte tra spermina e spermidina, detti amminoacidi a carica positiva sono scelti tra arginina e lisina, dette proteine a carica positiva sono scelte tra protamina e istoni, detti cationi metallici multivalenti sono scelti tra  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ .
18. Procedimento secondo la rivendicazione 17 in cui detti agenti condensanti di acid nucleici sono protamina.
19. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 18 in cui detto volume desiderato del complesso ottenuto al punto a. è lasciato equilibrare per un periodo di circa 60 minuti a temperatura ambiente
20. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 19 in cui detti lipidi cationici 1,2-dioleoil-3-trimetilammoniopropano (DOTAP), 3beta-[N-(N',N'-dimetilamminoetano)-carbamoil] colesterolo cloridrato (DC-Chol) e detti fosfolipidi dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e dioleilfosfocolina (DOPC) sono miscelati al punto c. in un rapporto reciproco scelto tra 1,5:0,5:1,5:0,5 o 1:1:1:1 o 0,5:1,5:0,5:1,5.
21. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 20 in cui detto solvente organico al punto c. è cloroformio o etanolo.
22. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 21 in cui detta incubazione al punto g. è effettuata per un periodo compreso tra circa 30 minuti e 3 ore.

23. Nano particelle secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11 per uso nella terapia genica.

WHAT IS CLAIMED IS

1. A multicomponent lipid nanoparticle comprising a core consisting of one or more nucleic acid molecules and one or more nucleic acids condensing agents; and an outer  
5 coating consisting of the cationic lipids 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and of the phospholipids dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and dioleoylphosphocholine (DOPC).
- 10 2. The lipid nanoparticle according to claim 1, wherein said nucleic acid molecules are selected from dsDNA (double strand DNA), ssDNA (single strand DNA), RNA, siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), mRNA, dsRNA ( double strand RNA), tRNA, miRNA (microRNA) or a mixture thereof.
- 15 3. The lipid nanoparticle according to claim 2 wherein said nucleic acid molecules are mini-chromosomes comprising sequences of interest, expression vectors comprising sequences of interest, transposable elements comprising sequences of interest.
4. The lipid nanoparticle according to any one of claims 1 to 3 wherein the ratio  
20 between the volume of said one or more nucleic acid molecules and said nucleic acids condensing agents is of about 1:0,75.
5. The lipid nanoparticle according to any of claims 1 to 4 wherein said one or more of nucleic acids condensing agents are selected from polyamines, cationic peptides,  
25 cationic lipids, cationic surfactants, positively charged amino acids, positively charged proteins, multivalent metal cations.
6. The lipid nanoparticle according to claim 5 wherein said polyamines are selected from spermine and spermidine, said positively charged amino acids are selected from

arginine and lysine, said positively charged proteins are selected from protamine and histones, said metal multivalent cations are selected from  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ .

7. The lipid nanoparticle according to any one of claims 1 to 6 wherein said core  
5 consists of nucleic acid and protamine, having a hydrodynamic diameter,  $D = 230 \pm 18$  nm, and a surface charge =  $- 19.5 \pm 2.5$  mV.

8. The lipid nanoparticle according to claim 7 wherein said nucleic acid condensing agents are protamine.

10

9. The lipid nanoparticle according to any one of claims 1 to 8 wherein said cationic lipids 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and said phospholipids dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and dioleoylphosphocholine (DOPC) are present in a reciprocal ratio selected from 1,5:0,5:1,5:0,5 or 1:1:1:1 or 0.5 : 1,5:0,5:1,5.

15

10. The lipid nanoparticle according to any one of claims 1 to 9 wherein the surface charge of said nanoparticle is positive and has a potential, z, of about + 42mV.

20

11. The lipid nanoparticle according to any of claims 1 to 10 having a diameter between 200 and 250 nm and a polydispersity index of  $<0.2$ .

25

12. A process for the preparation of multicomponent lipid nanoparticles comprising the following steps:

a. dissolving separately, at equal concentration in distilled  $\text{H}_2\text{O}$ , nucleic acid molecules and a pool of one or more condensing agents nucleic acids and then mixing the same together at a ratio of between 1:1 and 1:0.5 thus obtaining a negatively charged complex;

- b. allowing to equilibrate, for a period of between 30 and 180 minutes at room temperature, a desired volume of the complex obtained in step a.;
- c. preparing multicomponent cationic liposomes by individually dissolving the cationic lipids 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-  
5 dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and the phospholipids dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and dioleoylphosphocholine (DOPC) in a suitable organic solvent and mixing desired amounts of each lipid so dissolved thus obtaining a homogeneous mixture;
- d. completely removing the organic solvent from the mixture obtained in step c. thus  
10 obtaining a lipid film;
- e. hydrating the lipid film obtained in step d. with a suitable buffer at physiological cell pH thus obtaining a desired final concentration;
- f. sonicating the lipid solution obtained in step e. until a clear solution is obtained;
- g. interacting the balanced complex obtained in step b. with a suitable volume of the  
15 solution obtained in step f. at a charge ratio  $\rho$ , moles of cationic lipid/nucleic acid bases comprised between about 2 and 3, including the extremes, and incubating at about 37 °C until formation of the nanoparticles.
- 20 13. The process according to claim 12, wherein said solutions of nucleic acid and of said set of one or more condensing agents nucleic acids have a concentration of about 1mg/ml.
14. The process according to any one of claims 12 or 13, wherein said ratio at point a.  
25 is of about 1:0,75.
15. The process according to any one of claims 12 to 14 wherein said nucleic acid molecules are selected from dsDNA (double strand DNA), ssDNA (single strand DNA), RNA, siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA), mRNA, dsRNA  
30 (double strand RNA), tRNA, miRNA (microRNA) or a mixture thereof.

16. The process according to any one of claims 12 to 15 wherein said one or more nucleic acid condensing agents are selected from polyamines, cationic peptides, cationic lipids, cationic surfactants, positively charged amino acids, positively charged  
5 proteins, multivalent metal cations.

17. The process according to claim 16, wherein said polyamines are selected from spermine and spermidine, said positively charged amino acids are selected from arginine and lysine, said positively charged proteins are selected from protamine and  
10 histones, said multivalent metal cations are selected from  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ .

18. The process according to claim 17 wherein said nucleic acid condensing agents are protamine.

15 19. The process according to any one of claims 12 to 18, wherein said desired volume of the complex obtained in step a. is allowed to equilibrate for a period of about 60 minutes at room temperature

20. The process according to any one of claims 12 to 19 wherein said cationic lipids  
20 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride (DC-Chol) and said phospholipids dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and dioleoylphosphocholine (DOPC) are mixed at point c. in a reciprocal ratio selected from 1,5:0,5:1,5:0,5 or 1:1:1:1 or 0,5:1,5:0,5:1,5.

25

21. The process according to any one of claims 12 to 20 wherein said organic solvent in step c. is chloroform or ethanol.

22. The process according to any one of claims 12 to 21 wherein said incubation in  
30 step g. is carried out for a period between about 30 minutes and 3 hours.

23. Nanoparticles according to any one of claims 1 to 11 for use in gene therapy.

1/2

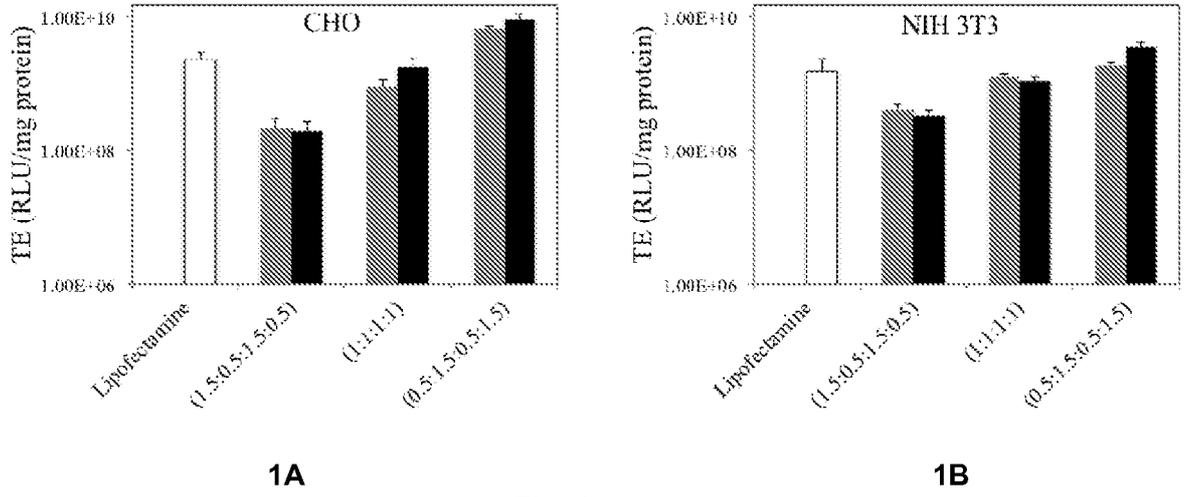


Fig. 1

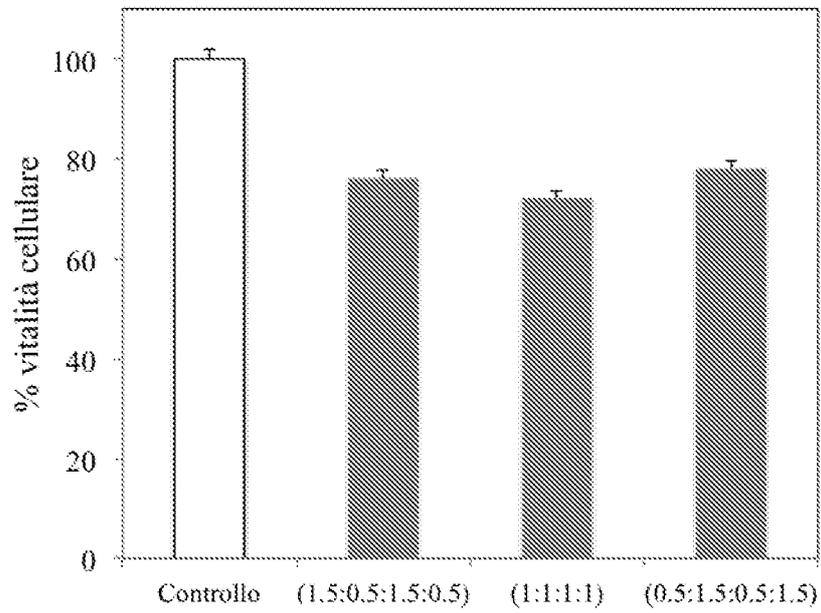
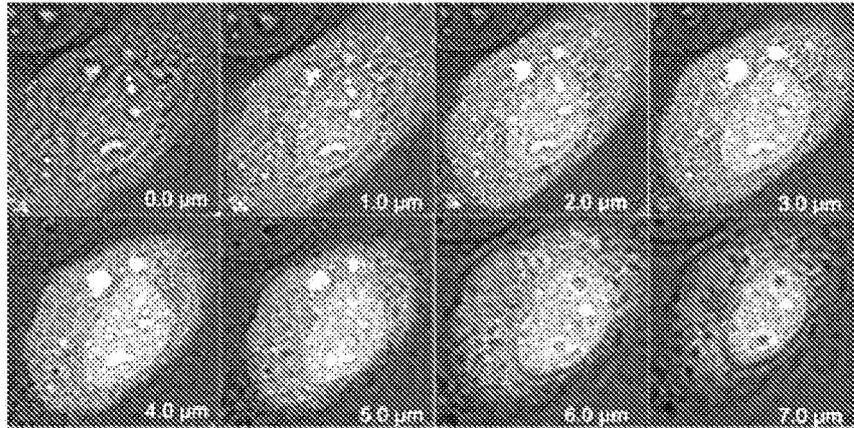
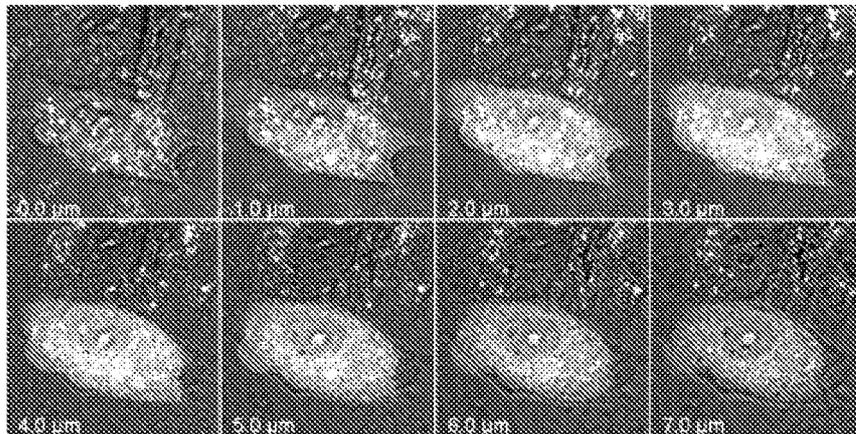


Fig. 2

2/2



3A



3B

Fig. 3