

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 646**

21 Número de solicitud: 201630417

51 Int. Cl.:

| | | | |
|---------------------|-----------|-------------------|-----------|
| A61K 31/7105 | (2006.01) | A61P 3/10 | (2006.01) |
| B82B 1/00 | (2006.01) | A61P 9/00 | (2006.01) |
| B82B 3/00 | (2006.01) | A61P 11/00 | (2006.01) |
| B82Y 5/00 | (2011.01) | A61P 25/28 | (2006.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) | | |
| A61P 35/04 | (2006.01) | | |
| A61P 3/00 | (2006.01) | | |

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:
05.04.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:
06.10.2017

Fecha de concesión:
27.07.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:
03.08.2018

73 Titular/es:
**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Edificio Emprendia - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (50.0%)**

72 Inventor/es:
**SÁNCHEZ BARREIRO, Alejandro;
FERNÁNDEZ PIÑEIRO, Inés;
BADIOLA, Iker y
MÁRQUEZ, Joana**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

54 Título: **NUEVOS VEHÍCULOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE miRNAs**

57 Resumen:
Nuevos vehículos para la transfección de miRNAs.
La presente invención se refiere a una nanopartícula que comprende (i) entre un 60% y un 99% en peso, con respecto al peso total de la nanopartícula, de un éster de sorbitán; (ii) una sustancia cargada positivamente; y (iii) un miRNA; a sus métodos de fabricación, y sus usos, especialmente en usos terapéuticos, como el tratamiento del cáncer.

ES 2 636 646 B1

NUEVOS VEHÍCULOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE miRNAs**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCÓN**

La presente invención se refiere a nuevos sistemas que comprenden miRNAs para su aplicación en los campos farmacéutico, cosmético o nutricional, entre otros. Estos sistemas permiten la administración más eficiente de distintos miRNAs, por ejemplo, en aplicaciones para el tratamiento del cáncer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

Los microRNAs, también comúnmente denominados miRNAs, son secuencias cortas de RNA que tienen la capacidad de interferir en procesos celulares. Esta capacidad ha despertado el interés en su potencial para aplicaciones médicas, cosméticas o nutricionales, entre otras. Se ha podido comprobar el potencial de muchos de estos miRNAs en ensayos biológicos, y hasta la fecha se han identificado aproximadamente un millar de estas sustancias naturales con potencial en diversas aplicaciones.

15 Hasta el momento, el principal problema para su uso es su corta vida cuando son administrados. Los miRNAs son especialmente sensibles al ataque de exonucleasas y tienen una semivida de minutos en el medio biológico. Esto ha disparado el interés por la búsqueda de medios de administración que permitan transportar los miRNAs de forma eficaz, evitando su rápida degradación *in vivo*.

20 Una de las primeras estrategias contempladas fue la modificación estructural de los miRNAs. Una de las variaciones más extendidas ha sido la modificación del grupo 2'-OH de la ribosa (Wu SY, Yang X, Gharpure KM, Hatakeyama H, Egli M, et al. (2014) 2'-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity. *Nat Commun* 5: 3459.). Ejemplos de estas modificaciones son la sustitución en esta posición por 2'-fluoro, 2'-O-metil o 2'-O-metoximetil, solo por mencionar algunos ejemplos.

25 Otra estrategia seguida ha sido el uso de vectores virales, por ejemplo, lentivirus o adenovirus, tal y como se explica en Kasar S, Salerno E, Yuan Y, Underbayev C, Vollenweider D, et al. (2012) Systemic *in vivo* lentiviral delivery of miR-15a/16 reduces malignancy in the NZB de novo mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Immun* 13: 109-119; o en Brandt MR, Kirste AG, Pozzuto T, Schubert S, Kandolf R, et al. (2013) Adenovirus vector-mediated RNA interference for the inhibition of human parvovirus B19 replication. *Virus Res* 176: 155-160. Sin embargo, y pese a que se han modificado genéticamente para eliminar su carga virulenta, la seguridad de estos vectores siempre despierta preocupación.

30 El campo de la oncología es donde posiblemente los miRNAs han recibido más atención hasta el momento. Este interés deriva del descubrimiento de que los miRNAs están desregulados en tejidos cancerosos y los tejidos que los rodean, y en la habilidad de los miRNAs para regular múltiples genes (por ejemplo, los siRNA son específicos y permiten la acción sobre un único gen), ya que se pueden unir a múltiples RNA mensajeros (mRNA) (GARZON, R., MARCUCCI, G. and CROCE, C.M., 2010. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(10), pp. 775-789).

35 Un ejemplo es el caso del cáncer colorectal y la metástasis de hígado, una de sus regiones más frecuentes de metástasis. Las células endoteliales sinusoidales del hígado (LSECs) juegan un papel clave en el desarrollo y regulación de la metástasis de hígado. Se ha encontrado que algunos miRNAs (miR-20a; miR-29 y miR-652) están desregulados en las LSECs, y la recuperación de sus niveles normales se presenta como una alternativa terapéutica prometedora.

40 En vista del potencial de los miRNAs y sus dificultades en la administración, se ha probado la utilización de vectores no virales, por ejemplo, liposomas, péptidos, anticuerpos y otros ligandos, como el quitosano. Así, se ha buscado la mejora en la transfección de diferentes miRNAs con los agentes habituales como, por ejemplo, los de la familia lipofectamine® (DOTAP, DOTMA o DOPE) o Smarticles® (derivados amfotéricos). Por ejemplo, el miR-34a se encuentra ahora en fases clínicas en forma de liposomas Smarticles® para el tratamiento del cáncer de hígado, y el miR-16 en forma de nanopartículas de EnGeneIC (minicell; EP2386640) para el tratamiento de mesotelioma pleural maligno. Esta situación contrasta con la de medicamentos basados en siRNAs, otra familia diferente de RNAs que tienen doble cadena, los cuales no están encontrando tantos problemas en la búsqueda de vehículos adecuados para su transfección, y para los cuales existen ya multitud de ensayos clínicos en marcha.

45 Dado el reciente interés despertado por los miRNAs como agentes terapéuticos, existe una necesidad en encontrar y desarrollar nuevos vehículos para una administración más efectiva (LAM, J.K., CHOW, M.Y., ZHANG, Y. and LEUNG, S.W., 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular therapy.Nucleic acids*, 4, pp. e252). Sin embargo, los esfuerzos en el caso de los miRNAs se está viendo especialmente dificultados por ser moléculas de naturaleza hidrofílica, alto peso molecular y carga negativa, que impiden su paso a través de la membrana celular.

50 El uso de vectores no virales mencionados arriba reduce estos problemas, sin embargo, especialmente en el caso de sistemas nanométricos, crea otras dificultades. El sistema reticuloendotelial (RES) absorbe rápidamente los sistemas nanométricos, y es la causa de la escasa estabilidad *in vivo* (y por tanto, escasa eficacia) de muchos de ellos (RINKENAUER, A.C., PRESS, A.T., RAASCH, M., PIETSCH, C., SCHWEIZER, S., SCHWORER, S., RUDOLPH, K.L., MOSIG, A., BAUER, M., TRAEGER, A. y SCHUBERT, U.S., 2015. Comparison of the uptake of methacrylate-based nanoparticles in static and dynamic *in vitro* systems as well as in

vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 216, pp. 158-168; SADAUSKAS, E., WALLIN, H., STOLTENBERG, M., VOGEL, U., DOERING, P., LARSEN, A. y DANSCHER, G., 2007. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Particle and fibre toxicology*, 4, pp. 10). El RES comprende células fagocitarias como los monocitos o los macrófagos, por ejemplo, las células de Kupffer. Aunque es generalmente aceptado que existe una correlación entre la carga superficial positiva de la nanopartícula y una menor absorción por parte de las células fagocitarias, no se conoce con exactitud qué factores influyen en esta absorción, lo que dificulta la predicción sobre el tipo de sistemas nanométricos que tendrán una estabilidad adecuada *in vivo*.

El desarrollo de vehículos con propiedades mejoradas para la administración de miRNAs resulta por tanto de gran interés.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve los problemas mencionados anteriormente descritos, mejorando la estabilidad de los miRNAs *in vivo*. Los investigadores han podido comprobar que los sistemas de la presente invención mejoran sorprendentemente el transporte *in vivo* de los miRNA, y su eficacia se ve sorprendentemente incrementada. Se ha podido comprobar que evita su degradación por parte del RES, y en particular evita la fagocitación por parte de las células de Kupffer.

Por tanto, un primer aspecto de la invención es una nanopartícula que comprende (i) entre un 60% y un 99% en peso, con respecto al peso total de la nanopartícula, de un éster de sorbitán; (ii) una sustancia cargada positivamente; y (iii) un miRNA.

La estabilidad de estos sistemas y la mejora en la transfección de miRNAs que aportan hacen las nanopartículas de la invención adecuadas para, por ejemplo, aplicaciones en el ámbito de la farmacia, la cosmética o la nutrición.

Un aspecto adicional es el uso de una nanopartícula de la invención para la preparación de un medicamento. También es un aspecto adicional una nanopartícula de la invención para su uso como medicamento.

Un aspecto adicional es el uso de una nanopartícula de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una indicación que se selecciona del grupo que consiste en cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas. También es un aspecto una nanopartícula de la invención para su uso en el tratamiento de una indicación que se selecciona del grupo que consiste en cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas.

Otra de las ventajas de la invención es que las nanopartículas son de fácil preparación, y la incorporación de los miRNAs se puede realizar de forma simultánea a la formación de la propia nanopartícula o en una etapa posterior de incubación, dependiendo de la naturaleza de los componentes, proporcionando así flexibilidad a su preparación. Así, un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de una nanopartícula de la invención que comprende (i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán sobre una solución acuosa; en donde dicha solución orgánica o dicha solución acuosa o ambas comprenden una sustancia cargada positivamente; y (ii) la etapa de evaporar disolvente orgánico y agua; y (iii) la etapa opcional de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de otras sustancias; en donde un miRNA se incorpora (a) durante la etapa (i) como parte de la solución acuosa, (b) en la etapa de incubación (iii), o en ambas etapas (i) y (ii).

Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Gel de electroforesis que confirma la existencia de una asociación efectiva entre un miRNA y las nanopartículas. A: banda correspondiente al miR-20a libre (5 µg/ml). B: banda en la que no se observa miR-20a libre, correspondiente al SP80-OA-CS-miR-20a (50 µg/ml miR-20a).

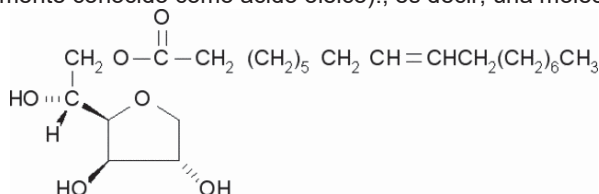
Figura 2. Demostración del efecto terapéutico *in vivo*. Regulación clínica de la metástasis de hígado mediante el uso de nanopartículas según la invención SP80-OA-CS-miR-20a. Se inyectaron en ratones líneas celulares de cáncer colorectal murino c26 (200.000 células/animal). Los animales se trataron a partir del día 3 tras la inoculación del tumor, y subsiguientemente cada 3 días hasta el día 21. En el día 21 los animales se sacrificaron y sus hígados se procesaron para el análisis histológico. Los ratones se separaron en 5 grupos de tratamiento. El grupo 1 se trató con placebo (glucosa); el grupo 2 (según la invención) con SP80-OA-CS-miRNA-20a; el grupo 3 con miRNA-20a libre, sin ningún vehículo específico; el grupo 4 con una nanopartícula SP80-OA-CS asociada a un miRControl (un miRNA que no ataca ninguna diana); el grupo 5 con nanopartículas SP80-OA-CS sin ningún miRNA. La evaluación macroscópica de los hígados confirmó el efecto terapéutico en términos de regulación clínica en los animales tratados con SP80-OA-CS-miRNA-20a (grupo 2).

Figure 3. Demostración del efecto terapéutico *in vivo*. Análisis histológico. Se tiñeron con hematoxilina-eosina secciones de los hígados evaluados en la figura 2, y se cuantificó bajo el microscopio el área ocupada por el tumor. Los distintos grupos se relacionaron con el grupo control (grupo 1 tratado con placebo) mediante el test-T. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) se marcan con *. También se comparó el grupo 2 (tratados con SP80-OA-CS-miRNA-20a) con el grupo 5 (tratados con SP80-OA-CS sin miRNA) y su diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) indicada con +.

DESCRIPCIÓN DETALLADA**Definiciones**

5 Para la nomenclatura de las nanopartículas de la invención se utiliza la fórmula [éster de sorbitán]-[sustancia cargada positivamente]. Si la nanopartícula tiene otros componentes, por ejemplo, una sustancia cargada negativamente, se indica a continuación separado por un guion. En algunos caso se indica al final el nombre del miRNA utilizado. Además se utilizan las siguientes abreviaturas:

10 SP80: se entiende como Span-80®. El span-80® es una sustancia que resulta de esterificar el sorbitán con ácido *cis*-9-octadecenoico (comúnmente conocido como ácido oleico);, es decir, una molécula con la siguiente fórmula:



Span-80®

OA: oleilamina, es decir, (Z)-octadec-9-enilamina.

CS: sulfato de condroitina. Su estructura y propiedades se explica abajo con mayor detalle.

15 HA: ácido hialurónico. Su estructura y propiedades se explica abajo con mayor detalle.

Así, por ejemplo, una nanopartícula que se abrevia SP80-OA-HA-miR-20a, será una que incorpora Span-80®, oleilamina, ácido hialurónico y miR-20a, preparada de acuerdo con los procedimientos descritos aquí.

En el presente documento se ha seguido para los miRNAs su nomenclatura estándar. Se ha utilizado el prefijo "miR-" seguido por un guion y un número. De acuerdo con la nomenclatura estándar el prefijo "miR" con "R" mayúscula se reserva para los miRNAs maduros, mientras que el prefijo "mir-" con "r" minúscula suele reservarse para los pre-miRNAs, y el prefijo "MIR" para el gen que los codifica. Para los propósitos de la presente invención, el prefijo "miR-" los incluye todos, los miRNAs maduros, los pre-miRNAs y los genes que los codifican. Tras el número algunos miRNAs incorporan una letra que permite distinguir miRNAs con secuencias muy similares.

20 Se entiende por "alquilo" una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que no contiene ninguna insaturación, de 1 a 40 átomos de carbono a menos que se indique lo contrario, opcionalmente sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre -ORb, -SRb, -NRaRb, -C(O)Rb, -CO₂Rb, -C(O)NRaRb, -NRaC(O)Rb, NRaC(O)ORb, -NRaC(O)NRaRb, -CF₃, -OCF₃; donde Ra y Rb se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆ y alquino C₂-C₆.

25 Se entiende por "alqueno" una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene al menos un doble enlace, de 2 a 40 átomos de carbono a menos que se indique lo contrario, opcionalmente sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre -ORb, -SRb, -NRaRb, -C(O)Rb, -CO₂Rb, -C(O)NRaRb, -NRaC(O)Rb, -NRaC(O)ORb, -NRaC(O)NRaRb, -CF₃, -OCF₃; donde Ra y Rb se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆ y alquino C₂-C₆.

30 Se entiende por "alquino" una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene al menos un triple enlace, de 2 a 40 átomos de carbono a menos que se indique lo contrario, opcionalmente sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre -ORb, -SRb, -NRaRb, -C(O)Rb, -CO₂Rb, -C(O)NRaRb, -NRaC(O)Rb, -NRaC(O)ORb, -NRaC(O)NRaRb, -CF₃, -OCF₃; donde Ra y Rb se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆ y alquino C₂-C₆.

35 Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes en peso que se indican en el presente texto se calculan con referencia a la suma de todos los componentes añadidos a la mezcla en la formación de la nanopartícula, con excepción de los disolventes. Por ejemplo, para una nanopartícula SP80-OA-HA-miR-20a, el porcentaje en peso de SP80 serán los gramos de SP80 añadidos para la preparación de la nanopartícula, multiplicado por cien, y dividido entre la suma de gramos de SP80, OA, HA y miR-20a añadidos para la preparación de la nanopartícula.

40 Cuando se utiliza la partícula "un" o "una" se debe entender como "al menos un(a)" o "un(a) o más". Por ejemplo, "un miRNA" indica que el número de miRNAs presentes es al menos 1, pero que pueden existir mezclas de 2 o más miRNAs.

Componentes de las nanopartículas de la invención

45 Las nanopartículas de la invención comprenden ésteres de sorbitán. El sorbitán está constituido por una mezcla de anhídridos cíclicos del sorbitol, como, por ejemplo, el 1,4-anhidrosorbitol, 1,5-anhidrosorbitol y 1,4,3,6-dianhidrosorbitol. Los ésteres de sorbitán se consideran tensioactivos no iónicos debido a que contienen dos regiones localizadas, una de naturaleza hidrófila y otra hidrófoba.

50 Se entiende por "ésteres de sorbitán" los derivados esterificados del sorbitán donde los grupos éster poseen un sustituyente seleccionado de entre alquilo, alqueno y alquino. Los ésteres de sorbitán incluyen derivados en los que uno, dos, tres o cuatro grupos hidroxilo están esterificados, e incluso incluyen derivados esterificados en los que una molécula de éster está presente por cada dos moléculas de sorbitán (en cuyo caso se nombran con el prefijo "sesqui-"). Así, por ejemplo, el monooleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultado de la esterificación

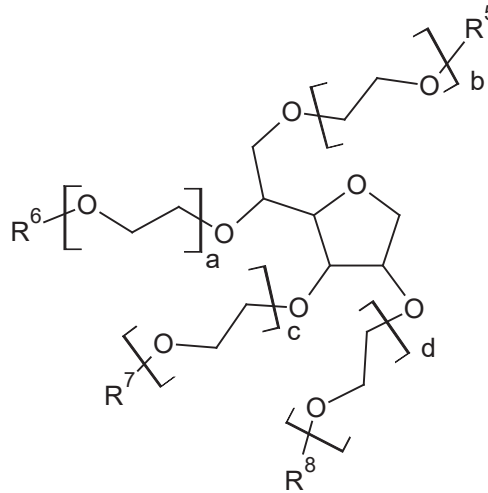
de un grupo hidroxilo con el ácido oleico; el trioleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultante de la esterificación de tres grupos hidroxilo del sorbitán con el ácido oleico.

Existen muchos tipos distintos de ésteres de sorbitán atendiendo al número de hidroxilos esterificados, la estructura del éster, la mezcla de anhidrosorbitol, y otros factores. El experto en la materia puede elegir entre distintos tipos dentro del ámbito de la invención y no está limitado a un tipo específico.

Ésteres de sorbitán comúnmente utilizados son, por ejemplo, los comercializados con el nombre Span® (sin bloques de polioxietileno) o Tween® (con bloques de polioxietileno). Por mencionar algunos ejemplos, ésteres de sorbitán de la familia Span® comunes pueden ser el Span-80® (monooleato de sorbitán), el Span-20® (monolaurato de sorbitán), el Span-40® (monopalmitato de sorbitán), el Span-65 (tristearato de sorbitán), o el Span-85® (trioleato de sorbitán). Ésteres de sorbitán de la familias Tween® comunes son el Tween® 20 (Polioxietilensorbitan monolaurato), Tween® 40 (Polioxietilensorbitan monopalmitato), Tween® 60 (Polioxietilensorbitan monoestearato) o Tween® 80 (Polioxietilensorbitan monooleato).

La formación de las nanopartículas de la invención puede comprender mezclas de dos o más ésteres de sorbitán diferentes. Por ejemplo, una mezcla de un éster de sorbitán sin bloques de polioxietileno con otro éster de sorbitán con bloques de polioxietileno. En la preparación de las nanopartículas de la invención el experto en la materia puede elegir pues diversos ésteres de sorbitán para combinar con la sustancia cargada positivamente, y a modo de ejemplo, se puede seleccionar del grupo que comprende monooleato de sorbitán, dioleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, sesqui-oleato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, dilaurato de sorbitán, trilaurato de sorbitán, sesqui-laurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, diestearato de sorbitán, tristearato de sorbitán, sesqui-estearato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, dipalmitato de sorbitán, tripalmitato de sorbitán, sesqui-palmitato de sorbitán y combinaciones de los mismos.

Teniendo en cuenta que dichos ésteres de sorbitán opcionalmente comprenden bloques de polioxietileno, el éster de sorbitán utilizado en las nanopartículas de la invención puede ser un compuesto de fórmula I



Fórmula I

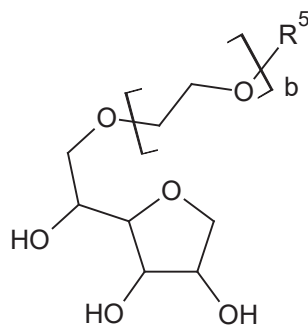
en donde

cada uno de R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -(C=O)-alquilo C₁-C₄₀, -(C=O)-alqueno C₂-C₄₀, -(C=O)-alquino C₂-C₄₀, con la condición de que al menos uno de R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ no es -H; y

cada uno de a, b, c y d es independientemente un número entre 0 y 100.

Aquellos más habituales son los comercialmente disponibles y suelen corresponder a un alquilo lineal que comprende entre 2 y 20 átomos de carbono, por ejemplo, uno con 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono, o a un grupo alqueno lineal que comprende entre 4 y 25 átomos de carbono. Así, un ejemplo puede ser un grupo alqueno de fórmula -(CH₂)_n-CH=CH-(CH₂)_m-CH₃, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10. Uno habitualmente utilizado aquél en el que n es 7 y m es 7, correspondiente al ácido oleico. Como se puede ver, los bloques de polioxietileno son opcionales, y cada uno de a, b, c y d pueden ser 0. En el caso de incluir dichos bloques de polioxietileno, la suma de a, b, c y d puede ser, por ejemplo, de entre 10 y 50 o de entre 10 y 30 o de entre 15 y 30. Por ejemplo, en el caso del Tween® 80 (Polioxietilensorbitan monooleato) a, b, c y d suman 20.

De acuerdo con una realización preferida, R⁶, R⁷ y R⁸ son -H. Es decir, se trata de un monoéster de sorbitán, por ejemplo, uno que se selecciona del grupo que consiste en monooleato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, y combinaciones de los mismos. Este grupo de monoésteres de sorbitán puede representarse mediante la fórmula II



Fórmula II

en donde

R^5 se selecciona del grupo que consiste en $-(C=O)$ -alquilo C_1 - C_{40} y $-(C=O)$ -alqueno C_2 - C_{40} ; y

b es un número entre 0 y 100, preferiblemente 0.

De nuevo, se prefiere uno en donde R^5 es un alqueno de la fórmula $-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10.

La proporción de ésteres de sorbitán en las nanopartículas se sitúa entre el 60% y el 99% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula. Proporciones típicas en las que se encuentran los ésteres de sorbitán son entre el 80% y el 98% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula, por ejemplo, entre el 85% y el 95%. La proporción de los ésteres de sorbitán suele ser mayor del 87% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula.

Otro componente esencial de la invención es la inclusión de una sustancia cargada positivamente. En el contexto de la presente invención, se entiende por "sustancia cargada positivamente" aquella molécula dotada de carga eléctrica positiva. En el campo de la presente invención se utilizan estas sustancias para modular las propiedades de las partículas formadas, y el experto en la materia tiene a su disposición una amplia variedad de las mismas. Estas sustancias se discuten ampliamente en numerosos libros de referencia, por ejemplo, en "Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Volumen 4", James A. Schwarz, Cristian I. Contescu, Karol Putyera, Editor: Marcel Dekker, 2004, o en "Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Concise", Herman F. Mark, tercera edición, Editor: Wiley, 2007. Ejemplos no-limitativos son las sales de amonio, polímeros catiónicos y las aminas grasas o lipofílicas.

El polímero catiónico puede seleccionarse del grupo que consiste en protamina, poliglutámico, dextrano cationizado, Pululano cationizado, poliaminoácidos, proteínas cationizadas, y sus sales. Los poliaminoácidos son otra familia de sustancias cargadas positivamente que se pueden utilizar en las nanopartículas de la invención y que pueden seleccionarse del grupo que consiste en polilisina y poliarginina. Las proteínas cationizadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en gelatina, albúmina, colágeno, atelocolágeno, y sus derivados cationizados.

Las sales de amonio pueden ser sustancias que comprenden un grupo amonio o amina unido a uno, dos o tres restos que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_{40} , alqueno C_2 - C_{40} , alquino C_2 - C_{40} , por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y cloruro de benzalconio (BZC). La amina grasa puede ser oleilamina. Sustancias cargadas positivamente adecuadas para la presente invención pueden ser las sales de amonio o las aminas grasas, por ejemplo CTAB, BZC, oleilamina o mezclas de las mismas. Así, dicha sustancia cargada positivamente puede tener la fórmula $(R^{10})_p (R^{11})(R^{12})NR^9$, en donde

cada uno de R^{10} , R^{11} y R^{12} se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, alquilo C_1 - C_4 , alqueno C_2 - C_4 , alquino C_2 - C_4 , y fenilalquilo C_7 - C_{15} ;

R^9 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_{40} , alqueno C_2 - C_{40} , alquino C_2 - C_{40} ;

p es 0 o 1;

y en donde también comprende un contraión en el caso en el que p es 1. Cuál es el contraión no es crítico y puede ser, por ejemplo, un halogenuro (F^- , Cl^- , Br^- o I^-).

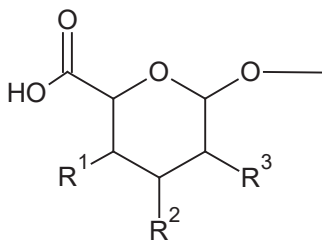
La sustancia cargada negativamente se puede añadir en proporciones que van desde el 1% hasta el 39% en peso con respecto al peso total de las nanopartículas. Cantidades preferidas oscilan entre el 2% y 20%, típicamente entre el 3% y el 12% o entre el 2% y 9% o entre el 3% y el 8%, en peso con respecto al peso total de la nanopartícula.

Un componente opcional de las nanopartículas de la invención es una sustancia cargada negativamente. Estas sustancias son conocidas por el experto en la materia y en el caso de la presente invención se prefieren aquellas capaces de formar una capa de recubrimiento en la nanopartícula. La familia de sustancias cargadas negativamente puede ser de acuerdo con la presente invención un polímero aniónico, entendiendo polímero aniónico un polímero con una carga negativa.

Los investigadores han comprobado que la incorporación de una o más sustancias cargadas negativamente proporcionan ventajas sorprendentes. En contra de lo que cabría esperar de un sistema con una carga superficial negativa, soportan los ataques del RES (no se observó fagocitación por las células de Kupffer) y las nanopartículas mejoran la capacidad de transfección del miRNA transportado. Esto es contrario a las

observaciones descritas en la literatura en la que se establece una correlación positiva entre la carga negativa y una mayor fagocitación por las células de Kupffer.

Los polímeros aniónicos son preferiblemente polisacáridos. Existe una gran variedad de estos polisacáridos a disposición del experto en la materia, y que se utilizan frecuentemente en este campo. Una variedad preferida son aquellos que contienen un grupo carboxilo (-COOH) o sulfato (-SO₃H) en el monómero que se repite. Se han mostrado especialmente adecuados para la presente invención aquellos polisacáridos que tienen al menos un ácido glucurónico en la estructura que se repite. Por ejemplo, dicha sustancia cargada negativamente puede comprender un polisacárido cuya unidad repetitiva tiene la fórmula [X-Y-(Z)_n] en donde n es 0 o 1; X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; con la condición de que al menos uno de X, Y y Z comprende un azúcar ácido y en donde los grupos X, Y y Z se unen entre sí a través de enlaces -O-glucosídicos. De acuerdo con una realización de la invención, dicho azúcar ácido se selecciona del grupo formado por los ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos y mezclas de los mismos. Por ejemplo, Y puede comprender un azúcar ácido, por ejemplo, un ácido urónico. Un ejemplo no limitativo de dicho ácido urónico puede ser uno de la fórmula III



Fórmula III

en donde

cada uno de R¹, R² y R³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -O-, -OR⁴, N(H)-R⁴ y -O-SO₃, con la condición de que al menos uno de R¹, R² y R³ sea -O-,

en donde los -O- forman los enlaces glucosídicos, y

en donde R⁴ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄, alquino C₂-C₄, -(C=O)-alquilo C₁-C₄, -(C=O)-alqueno C₂-C₄, -(C=O)-alquino C₂-C₄.

Ejemplos no limitativos de sustancias cargadas negativamente que tienen esta fórmula se seleccionan del grupo que consiste en ácido hialurónico, sulfato de condroitina y goma xantana.

Las sustancias cargadas negativamente que pueden incorporarse a las nanopartículas de la presente invención también pueden ser aquellas que se seleccionan del grupo que consiste en ácido hialurónico, ácido colomínico, polisialílico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furcelaranos, alginatos, agar agar, glucomanano, goma gelano, goma garrofín, goma guar, goma tragacanto, goma arábica, goma xantano, goma karaya, pectinas, celulosas, almidones, sus sales, fragmentos, derivados y mezclas de los mismos.

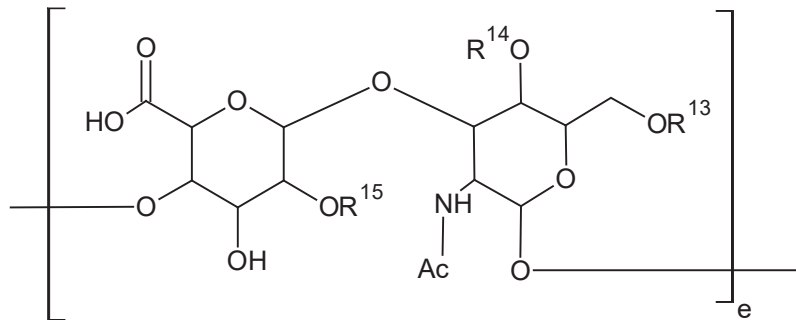
El hialuronano es un polímero lineal que comprende la repetición de una estructura de disacárido formada por la adición alterna de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos alternando enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glucosídicos. En el contexto de la presente invención, se puede emplear ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos moleculares. El ácido hialurónico de elevado peso molecular es comercialmente disponible, mientras que el de peso molecular inferior puede obtenerse mediante la fragmentación del ácido hialurónico de elevado peso molecular, utilizando, por ejemplo, una enzima hialuronidasa. El término "hialurónico, ácido hialurónico, hialuronano" tal como se utiliza en la presente descripción incluye o bien el ácido hialurónico o bien una base conjugada del mismo (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina del ácido hialurónico que incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, sales orgánicas tales como sales de aminoácidos básicos a pH neutro, preferiblemente dichas sales son farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la invención, la sal alcalina es la sal de sodio del ácido hialurónico.

La familia de los ácidos polisialílicos, término que incluye al ácido colomínico, se encuentra integrada por polímeros lineales constituidos por residuos de ácido N-acetilneuraminico (Neu5Ac; también conocido como ácido siálico), un constituyente natural de células y tejidos, unidos por enlaces glicosídicos α-(2→8). Cada residuo de ácido N-acetilneuraminico posee un grupo carboxilo, responsable de la carga negativa del ácido colomínico. Se trata de un material biocompatible y biodegradable, no inmunogénico, cuyos productos de degradación no son tóxicos (Gregoriadis G et al. Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57, 1964-1969).

El sulfato de dextrano es un glucano (polisacárido) complejo constituido por unidades de moléculas de glucosa, cada una de las cuales contiene aproximadamente dos grupos sulfato. El sulfato de dextrano se prepara mediante sulfatación de dextrano y posterior purificación mediante procedimientos de sobra conocidos por un experto en la materia.

La heparina es una sustancia de origen natural de la familia de los glicosaminoglicanos cuya estructura química comprende la repetición de unidades monoméricas disacáridas de ácido 2-O sulfo-L-idurónico y 2-deoxi-2-sulfamido-D-glucopiranosil-6-O-sulfato. En el contexto de la presente invención, es posible emplear tanto la heparina fraccionada como la no fraccionada. La heparina tradicional o no fraccionada se distingue claramente de la heparina fraccionada o de bajo peso molecular. La primera de ellas es una sustancia natural presente en

5 todos los vertebrados. Ambos tipos de heparina se pueden utilizar en forma de base libre o en forma de sal, como por ejemplo su sal sódica o cálcica. La heparina fraccionada o de bajo peso molecular se produce por despolimerización química o enzimática de heparinas convencionales. Ejemplos de este tipo de heparinas son enoxaparina, parnaparina, dalteparina y nadroparina, así como sus sales tales como las sales de sodio y calcio. Los derivados de heparina también pueden ser empleados en la composición de los sistema nanoparticulares de la presente invención. Estos derivados son conocidos en el estado de la técnica y se originan como consecuencia de la reactividad de los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. Así, heparinas N-acetiladas, O-d Descarboxiladas, oxidadas o reducidas son ampliamente conocidas. El sulfato de condroitina es un glucosaminoglucano (GAG) sulfatado compuesto por una cadena de azúcares alternados. Se encuentra normalmente unido a proteínas como parte de un proteoglicano. En el contexto de la presente invención, el término "sulfato de condroitina" incluye todos sus diferentes isómeros y derivados, así como combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se selecciona entre las siguientes sustancias y combinaciones de las mismas, resumidas en la fórmula IV



IV

- sulfato de condroitina A que está sulfatado predominantemente en el carbono 4 del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) y que también se conoce como sulfato de 4-condroitina ($R^{13}=H$, $R^{14}=SO_3H$ y $R^{15}=H$);
- sulfato de condroitina B que se denomina también sulfato de dermatano. Esta sustancia está compuesta por unidades de repetición lineales que contienen N-acetilgalactosamina y o bien ácido L-idurónico o bien ácido glucurónico, y cada disacárido puede estar sulfatado una vez o sulfatado dos veces. Está presente mayoritariamente en la piel, pero también se encuentra en vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendones y pulmones.
- sulfato de condroitina C que está sulfatado predominantemente en el carbono 6 del azúcar GalNAc y que se conoce también como sulfato de 6-condroitina ($R^{13}=SO_3H$, $R^{14}=H$ y $R^{15}=H$);
- sulfato de condroitina D que está sulfatado predominantemente en el carbono 2 del ácido glucurónico y en el carbono 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina ($R^{13}=SO_3H$, $R^{14}=H$ y $R^{15}=SO_3H$);
- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 4,6-condroitina ($R^{13}=SO_3H$, $R^{14}=SO_3H$ y $R^{15}=H$); y en donde "e" representa el número de repeticiones del monómero, es decir, su grado de polimerización.

El término "sulfato de condroitina" también incluye sales orgánicas e inorgánicas del mismo. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, mediante reacción de la forma básica de este compuesto con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales inorgánicas incluyen, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y las sales orgánicas incluyen, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquileto- etanolamina, trietanolamina, glucamina y aminoácidos básicos. Preferiblemente las sales son farmacéuticamente aceptables.

El sulfato de queratano es un glucosaminoglucano sulfatado similar al sulfato de condroitina en el que el grupo sulfato se encuentra en el glucurónico. Concretamente, se encuentra constituido por galactosa y GlcNAc-6-sulfato, unidos mediante un enlace β -1,4.

La carragenina o carragenano está formada por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos -1,3 y -1,4. Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de grupos de anhidrogalactosa se distinguen varios tipos de carragenano, todos incluidos en el ámbito de la presente invención.

El glucomanano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica lineal con una pequeña proporción de ramificaciones. En concreto, está formado por unidades de D-manosa y D-glucosa unidas por enlaces -1,4 en una proporción de 1.6:1, respectivamente. En una realización particular de la invención, el glucomanano empleado es un derivado de

glucomanano con carga negativa seleccionado entre los derivados fosforilados, carboximetil y dicarboxi-glucomananos.

La goma gelano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica formada por unidades de α -L-ramosio, β -Dácido glucurónico y dos unidades de β -D-glucosa. El polímero puede encontrarse en forma parcialmente acetilada. Dependiendo de su grado de acetilación, la goma gelano proporciona geles con propiedades mecánicas distintas. En el contexto de la presente invención, el término "goma gelano" incluye todos sus diferentes derivados, así como combinaciones de los mismos.

Sin querer estar limitado por la teoría, pensamos que las nanopartículas de la invención son estructuras sólidas homogéneas en las que los miRNAs son adsorbidos. Esto es contrario a los sistemas utilizados para transportar miRNAs que se han venido utilizando hasta ahora. Como ya se ha mencionado arriba, los que se están utilizando ahora para la realización de ensayos clínicos de miRNAs utilizan liposomas o vesículas, es decir, estructuras de bicapa lipídica que encierran en su interior una fase acuosa. Los miRNAs quedan unidos a la estructura sólida que forman los ésteres de sorbitol y la sustancia cargada positivamente.

El tamaño medio de las nanopartículas de la invención es de entre 1 y 999 nanómetros. Y pueden tener un potencial negativo o positivo, dependiendo de los componentes añadidos, por ejemplo, si comprenden o no una sustancia cargada negativamente, o de la concentración del o de los miRNA(s) añadido(s). De acuerdo con una realización preferida, la nanopartícula de la invención tienen un potencial positivo comprendido entre +1 y +100 mV. De acuerdo con otra realización preferida, la nanopartícula de la invención tienen un potencial negativo comprendido entre -25 y -40 mV.

Las nanopartículas de la invención pueden incluir otras sustancias auxiliares, por ejemplo, un derivado de óxido de etileno, un compuesto en el que se repite una unidad $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. Dicho derivado de óxido de etileno puede ser un compuesto de fórmula $\text{R}^{16}\text{O}[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_f-\text{C}(\text{H})(\text{R}^{17})(\text{R}^{18})$, en donde R^{17} es un grupo carbonilo o hidrógeno; R^{18} es un grupo alquilo, alqueno o alquino, de entre 2 a 24 átomos de carbono; R^{16} es hidrógeno o un grupo alquilo de entre 1 a 6 átomos de carbono; f es un valor de entre 1 y 100, por ejemplo, entre 1 y 50, o entre 1 y 24. Ejemplos de derivados de óxido de etileno, sin limitarse a éstos, son polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), polietilenglicol hexadecil éter (Brij 56), polietilenglicol 2-octadecil éter (Brij 72), polietilenglicol 8-octadecil éter (Brij 78), polietilenglicol 8-estearato (Myrj 45), 2-hidroxiethyl octadecanoato (Myrj 52), monoestearato de etilén glicol.

Los derivados de óxido de etileno se pueden incorporar en proporciones que varían entre el 0,1% y el 20% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula. Dependiendo de las aplicaciones, las proporciones pueden variar y ser de, por ejemplo, entre el 0,1% y el 15% o entre el 5% y el 15% o entre el 7 y el 13% en peso, con respecto al peso total de la nanopartícula.

Aplicaciones y miRNAs

El otro componente esencial de las nanopartículas de la invención es un miRNA o una mezcla de miRNAs, los cuales se suelen encontrar en proporciones por debajo del 25% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula. La proporción en la que se encuentran en cada caso puede ajustarse y puede ser, por ejemplo de entre 0,01 y 10% o entre 0,2% y 3% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula. Los miRNAs que se utilizan en las nanopartículas de la invención son moléculas de RNA que típicamente comprenden entre 5 y 30 bases o entre 15 y 25 bases.

Los miRNAs tienen múltiples aplicaciones, y por tanto también las nanopartículas de la invención, por ejemplo, en el campo farmacéutico, cosmético o de la nutrición. Así, por ejemplo, se estudia en la actualidad la aplicación terapéutica de diversos miRNAs en campos como el cáncer (miRNA-20a, miR-29, miR-652 miR-34a, miR-16), la diabetes o las enfermedades neurodegenerativas. Uno de los campos en los que más se ha desarrollado el uso de los miRNAs es el del cáncer. Por tanto, una realización preferida son las nanopartículas de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer que se selecciona del grupo que consiste en colorectal, mesotelioma pleural maligno, de hígado, páncreas, colon y las metástasis hepática y de pulmón.

El término "tratamiento" o "tratar" en el presente documento significa administrar las nanopartículas de la invención para prevenir, reducir o eliminar uno o más de los síntomas o causas o efectos (metástasis) de una enfermedad o condición. También abarca la prevención, reducción o eliminación de las secuelas de dicha enfermedad o condición, o de los efectos secundarios o adversos provocados por otra medicación utilizada. También abarca la administración para mantener la salud en sujetos en riesgo de padecer dicha enfermedad. El término "reducir" se entiende como cualquier mejora en la situación del paciente, bien medido por parámetros subjetivos (por ejemplo, percepción del paciente) u objetivos (medición de parámetros fisiológicos, bioquímicos, histopatológicos, microbiológicos-analíticos).

Por ejemplo, las nanopartículas de la invención para su uso en el tratamiento de la metástasis de hígado es una realización de la invención, y se ha podido comprobar que permiten reducir o eliminar la metástasis y los efectos dicha metástasis de hígado que acompaña muchas veces al cáncer colorectal, lo cual también constituye una realización de la invención. En una realización las nanopartículas de la invención comprenden miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de las mismas, preferiblemente miRNA-20a, para su uso en el tratamiento del cáncer colorectal y/o su metástasis de hígado asociado.

Otro aspecto de la invención es un método para el tratamiento de un individuo en necesidad de tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de nanopartículas de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de principio activo

calculada para producir el efecto deseado y estará determinada generalmente, entre otros motivos, por las propias características del principio activo utilizado y el efecto terapéutico que va a obtenerse. En una realización particular, la dosis de principio activo administrada a un sujeto para el tratamiento o la profilaxis de los estados mencionados anteriormente está en el intervalo de 10^{-10} a 10^{10} mg/kg de peso corporal, normalmente entre 10^{-3} y 10^3 mg/kg o entre 10^{-2} y 50 mg/Kg de peso corporal.

Por tanto, las nanopartículas de la invención pueden formar composiciones farmacéuticas junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. De hecho, se prefiere que todos los componentes sean farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción no deseada alérgica o similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano. Preferiblemente, tal como se utiliza en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

El término "excipiente" se refiere a un diluyente, adyuvante, o vehículo con el que se administran las nanopartículas de la invención. Son sustancias que, por ejemplo, se añaden a los principios activos o a sus asociaciones para servirles de vehículo, posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físicoquímicas del medicamento y su biodisponibilidad. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente agua o soluciones salinas de disolución acuosa y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

La composición farmacéutica o medicamento puede hallarse en cualquier forma adecuada para su administración a humanos y/o animales, preferentemente humanos, incluyendo bebés, niños y adultos y puede prepararse por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia. El medicamento puede prepararse por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, reflejado en "Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms, segunda edición, Aulton, M.E. (ed.) Churchill Livingstone, Edinburgo (2002); "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", segunda edición, Swarbrick, J. y Boylan J.C. (eds.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York (2002); "Modern Pharmaceutics", cuarta edición, Banker G.S. y Rhodes C.T. (eds.) Marcel Dekker, Inc. Nueva York 2002 y "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lachman L., Lieberman H. y Kanig J. (eds.), Lea & Febiger, Filadelfia (1986). Las descripciones respectivas se hallan incorporadas en este documento por referencia y forman parte de la descripción. La composición del medicamento puede variar dependiendo de la vía de administración. Ejemplos ilustrativos no limitantes de dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica de la invención incluyen formulaciones orales o bucales (líquidas, disolución, suspensión, emulsión, gel, pasta, polvo, liofilizado oral, comprimidos, cápsulas, píldoras, emulsiones); formulaciones sublinguales; formulaciones oftálmicas; formulaciones para el oído (óticas); formulaciones tópicas; formulaciones nasales; formulaciones rectales; formulaciones vaginales; formulaciones intrauterinas; formulaciones para inhalación o pulmonares; formulaciones parenterales, por ejemplo, formulación inyectables, por ejemplo, para inyecciones intravenosas o para inyecciones subcutáneas.

Procedimiento de preparación

Otra de las ventajas de la presente invención es la facilidad con la que se preparan las nanopartículas, procedimiento que no requiere inyección u homogeneización. En términos generales el procedimiento comprende (i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán sobre una solución acuosa; (ii) la etapa de evaporar el disolvente y el agua; y (iii) una etapa opcional de incubación. La sustancia cargada positivamente puede incorporarse a la solución orgánica o a la solución acuosa. Por otro lado, el miRNA (o los miRNAs) se incorpora(n), bien durante la etapa (i) como parte de la solución acuosa, bien en la etapa de incubación (iii), o bien en ambas etapas (i) y (iii). En caso de que no se incorpore ningún miRNA durante la etapa (i), es necesario proceder a la incubación (etapa (iii)) para incorporar el miRNAs (o los miRNAs).

Así, una alternativa es un procedimiento que comprende (i) la etapa de añadir una solución que comprende un disolvente orgánico, un éster de sorbitán y una sustancia cargada positivamente sobre una solución acuosa que comprende un miRNA; y (ii) la etapa de evaporar el disolvente y el agua. Otra alternativa comprende (i) la etapa de añadir una solución que comprende un disolvente orgánico, un éster de sorbitán y una sustancia cargada positivamente sobre una solución acuosa; (ii) la etapa de evaporar el disolvente y el agua; y (iii) la etapa de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de un miRNA. Procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en WO2013/068625.

A continuación se hace una descripción detallada que se complementará con los ejemplos.

La adición de la fase orgánica se realiza preferiblemente bajo agitación de la fase acuosa. Los componentes que adicionalmente puede comprender el sistema, como por ejemplo una sustancia cargada negativamente, pueden añadirse a la fase orgánica o a la fase acuosa, dependiendo de las características de la sustancia que se incorpore al sistema. Así, en una realización particular, la disolución acuosa además comprende una sustancia cargada negativamente.

Alternativamente, los componentes adicionales pueden incorporarse en una etapa posterior, por ejemplo, la etapa (iii) de incubación de la dispersión de nanopartículas formadas con una disolución que comprende alguna de estas sustancias.

Alternativamente, es posible obtener nanopartículas pegiladas o modificadas con derivados de óxido de etileno. Estas nanopartículas pegiladas o modificadas con derivados de óxido de etileno se pueden preparar en una única etapa y además tiene la ventaja de que no es necesario ninguna reacción química a fin de anclar las cadenas de óxido de etileno a la superficie de las nanopartículas. Así, en otra realización particular la fase orgánica comprende además un derivado de óxido de etileno, por ejemplo, uno de fórmula $R^{16}O[CH_2-CH_2-O]_pC(H)(R^{17})(R^{18})$ como los descritos más arriba.

Para la preparación de las nanopartículas de la invención normalmente es preferible que el disolvente de la fase orgánica sea un solvente hidromiscible, por ejemplo, un alcohol alifático, tal como el etanol, fácil de evaporar, más inocuo y estable frente a los componentes de las nanopartículas.

Las concentraciones de los diferentes componentes no es crítica. Por ejemplo, el éster de sorbitán se disuelve en la fase orgánica en una concentración que puede ser de entre 0,1 y 10 mg/ml, o entre 2 y 7 mg/ml. Por otro lado, las sustancia cargada positivamente puede estar en una concentración de entre 0,01 y 5,0 mg/mL, por ejemplo, entre 0,1 y 2,0 mg/mL preferiblemente entre 0,2 y 0,5 mg/mL. La sustancia cargada negativamente puede estar en una concentración de entre 0,01 y 5,0 mg/mL, por ejemplo, entre 0,05 y 2,0 mg/mL preferiblemente entre 0,1 y 0,3 mg/mL.

La mezcla de las fases acuosas y orgánica puede hacerse a temperatura ambiente o bien calentando una o ambas fases.

Se ha comprobado que las nanopartículas de la invención aguantan sin degradación la liofilización y otros procesos de deshidratación. Por tanto, el procedimiento puede comprender una etapa adicional de deshidratación total o parcial (liofilización o desecación, respectivamente). De este modo es posible preservarlas durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales y se reduzcan los volúmenes de producto que van a manipularse. El proceso de liofilización o desecación conduce, respectivamente, a un producto deshidratado total o parcialmente. En caso deshidratación, el procedimiento comprende una etapa adicional en la que se regeneran las nanopartículas deshidratadas parcialmente o liofilizadas. De este modo es posible deshidratar las nanopartículas para obtener un producto más estable durante el almacenamiento y posteriormente regenerar o recuperar las nanopartículas mediante un proceso de re-suspensión en un medio acuoso.

De este modo, un último aspecto de la invención se dirige a nanopartículas obtenibles como se describió anteriormente.

Los componentes descritos arriba se pueden combinar para que en cada caso la nanopartícula de la invención que resulta se adapte a la situación concreta, y la presente invención abarca distintas combinaciones de ésteres de sorbitán, sustancias cargadas positivamente, miRNAs, así como sustancias cargadas negativamente y otros componentes opcionales en caso de ser usados. Por ejemplo, una realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs (por ejemplo, miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de los mismos); (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$, tal y como se ha descrito más arriba; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. En otra realización, la presente invención comprende (i) uno o más miRNAs (por ejemplo, miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de los mismos); (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente que se selecciona del grupo que consiste en CTAB, BZC, oleilamina y mezclas de las mismas; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs; (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$, tal y como se ha descrito más arriba; y (iv) un polisacárido cargado negativamente en donde al menos uno de sus monómeros comprende un grupo $-COOH$ o $-SO_3H$.

Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs; (ii) un éster de sorbitán; (iii) una sustancia cargada positivamente; y (iv) un polisacárido cargado positivamente en donde al menos uno de sus monómeros comprende un grupo $-COOH$ o $-SO_3H$. Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs; (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$, tal y como se ha descrito más arriba; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. Las anteriores combinaciones y otras que no se describen explícitamente forman también parte del ámbito de protección.

Hay que tener en cuenta que, además del miRNA, las nanopartículas de la invención pueden comprender otros componentes como, por ejemplo, otros principios activos de interés, para lo cual bastaría con añadirlos, a la solución orgánica o a la solución acuosa o a ambas durante la preparación de la nanopartícula. También sería posible añadirlos durante la etapa adicional (iii) de incubación.

EJEMPLOS

Para la descripción de algunos de los siguientes ejemplos se hace referencia a resultados obtenidos mediante las siguientes técnicas:

El tamaño de las nanopartículas se determinó mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y usando un Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments, R.U.), obteniendo el

tamaño medio de la población y el índice de polidispersión del mismo. El procedimiento comprende diluir las muestras en agua Milli-Q a una proporción 1:19. Cada análisis se llevó a cabo a 25°C con un ángulo de detección de 173°.

El potencial zeta de las nanopartículas se detectó mediante la técnica de anemometría de dispersión de láser (LDA) usando un Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, R.U.). El procedimiento comprende diluir las muestras en solución de KCl milimolar.

La eficacia de la asociación de los miRNAs con las nanopartículas se determinó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. El procedimiento comprende preparar un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA, Tris 40 mM, ácido acético al 1%, EDTA 1 mM), pH 8 con SYBR®. Como sustancia de carga se usó tinción de gel de ácidos nucleicos de oro y glicerol. Se aplicó una diferencia de potencial de 25 mV durante 30 minutos y se usó miRNA libre como control.

Tal y como se usan en los siguientes ejemplos, se adquirieron los siguientes polímeros de diferentes establecimientos comerciales: ácido hialurónico (Bioibérica, España), sulfato de condroitina (Calbiochem, EE.UU.). El Span® 80 y la oleilamina se adquirieron de Sigma (España). Los diferentes miRNAs usados se adquirieron de Exiqon (Dinamarca). Los demás productos indicados en los ejemplos a continuación se adquirieron de Sigma (España).

Ejemplo 1: Prueba de concepto *In vivo* del efecto terapéutico en términos de regulación clínica de las metástasis hepáticas proporcionadas

Preparación de nanopartículas

Para la elaboración de las nanopartículas, se preparó una solución de monooleato de sorbitán (Span® 80, SP80) y oleilamina (OA) en 3 ml de etanol (fase orgánica) a una concentración de 6,6 y 0,33 mg/ml respectivamente. Después, esta fase orgánica se añadió a 6 ml de una fase acuosa agitada que contenía sulfato de condroitina (CS) a una concentración de 0,125 mg/ml, dando lugar de este modo a la formación espontánea de NPs. El etanol se retiró finalmente a presión reducida en un evaporador rotatorio. El miRNA se incluyó en la fase acuosa a una concentración de 8,33 µg/ml durante la elaboración de las nanopartículas. Para este propósito se seleccionó miR-20a. Estas proporciones corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de la nanopartícula de 91,67% de SP80, 4,63% de OA, 3,47% de CS y 0,23% de miR-20a.

Caracterización de las nanopartículas

Se midió el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas mediante espectroscopía de correlación fotónica (*photon correlation spectroscopy*) y anemometría Doppler laser (*laser Doppler anemometry*), respectivamente.

| Formulación | tamaño (nm) | PdI | ζ Potencial |
|-------------------------------------|--------------|-------|-------------|
| SP80-OA-CS | 115,9 ± 15,6 | 0,073 | -37,5 ± 1,5 |
| SP80-OA-CS-miR20 (50 µg/ml miR-20a) | 144,1 ± 1,7 | 0,062 | -31,9 ± 2,1 |

Tabla 1. Características físico-químicas de las nanopartículas de la invención

Eficiencia de la asociación entre el miRNA y la nanopartícula

La eficiencia de la carga del microRNA a las nanopartículas se confirmó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa, tal como se ilustra en la Figura 1.

Manejo de animales:

Todos los experimentos descritos en este trabajo se han llevado a cabo de acuerdo con las leyes españolas y europeas relativas al cuidado de animales para experimentación. La manipulación de animales y los métodos experimentales de nuestro laboratorio se han analizado y aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco, España. Se llevaron a cabo todos los esfuerzos para minimizar el número de animales empleados y su sufrimiento. Se obtuvieron ratones C57 BL/6NCrl (hembras, 8 semanas de edad) a través de Charles River Laboratories España, S.A. Se alojó a los ratones en la Unidad de Recursos Biológicos de la Universidad del País Vasco y se los mantuvo en un ambiente de temperatura controlada (21 ± 1 °C), humedad relativa del 55 ± 5%, ciclo de luz/oscuridad de 08h00-20h00 y se les suministró alimento para ratón convencional y agua *ad libitum*.

Modelo de metástasis hepática y evaluación clínica: Se desarrolló un modelo de metástasis hepática inyectando en los ratones una línea celular de cáncer colorrectal murino c26 (200.000 células/animal). Se anestesió a los animales con isofluorano (5% y 1,5% de mantenimiento) y se inyectaron las células en el bazo. Después de la intervención se suturaron las incisiones. Se trató a los animales en el día 3 después de la inoculación del tumor y posteriormente cada 3 días hasta el día 21 con una dosis total de 25 µg de miRNA por animal. Los ratones se separaron en 5 grupos diferentes dependiendo del tratamiento. El grupo 1 se trató con placebo (glucosa); el grupo 2, según la invención, se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con

miR-20a con un marcador fluorescente (6-carboxifluoresceína) (FAM); el grupo 3 se trató con miR-20a libre o desnudo (sin ningún vehículo específico); el grupo 4 se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con un miRControl (este miR no ataca a ningún mRNA); el grupo 5 se trató con las nanopartículas SP80-OA-CS en blanco (sin mRNA asociado). En el día 21 después de la inoculación se sacrificó a los animales y se observaron los hígados y se procesaron posteriormente para análisis histológico.

Histología:

Después de la dislocación cervical se extirparon rápidamente los hígados y se fijaron en paraformaldehído (PFA al 4%) en PBS, durante toda la noche a 4°C. Los hígados fijados se procesaron para su inclusión en parafina. Se montaron secciones seriadas de 10 µm de grosor en cinco series paralelas y se procesaron para hematoxilina-eosina. Se capturaron imágenes microscópicas en un microscopio Zeiss.

Algunas secciones de hígado se observaron 48 horas después de la última inyección. Las secciones se incubaron con marcador de receptor anti-manosa y anticuerpo Alexa 593 anti-ratón. El marcador verde del miR-20a (FAM) se observó dentro de las células endoteliales marcadas en rojo, lo que confirma el ataque endotelial o la distribución específica a las células endoteliales sinusoides que proporcionan las nanopartículas al miR-20a.

Después de la evaluación macroscópica de los hígados, se confirmó el efecto terapéutico en términos de regulación clínica de las metástasis hepáticas en el grupo de animales tratados con SP80-OA-CS asociadas con miR-20a (Figura 2).

Las secciones de los hígados de la Figura 2 se tiñeron con hematoxilina-eosina y se cuantificó el área ocupada por el tumor bajo el microscopio. Los diferentes grupos se relacionaron con el grupo de control (tratado con glucosa como placebo) usando del test-T. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se indicaron con un *. Asimismo, se compararon el grupo tratado con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con miR-20a y con nanopartículas de SP80-OA-CS en blanco (sin mRNA asociado) y la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) se indicó con un +. Tal como puede apreciarse en la Figura 3, el área ocupada por el tumor fue sorprendentemente más pequeña en los ratones tratados con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con miR-20a (según la invención) que en ratones tratados solo con miR-20a.

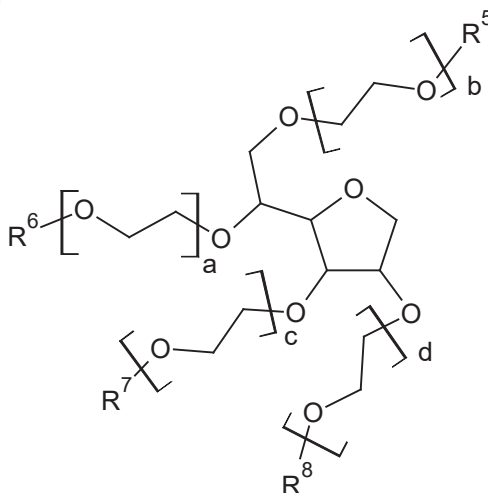
Esto confirma una mejora imposible de anticipar *a priori* de las nanopartículas según la invención en la vehiculización de miRNAs *in vivo*. Más aún, resulta sorprendente el efecto terapéutico proporcionado por estas nanopartículas en términos de regulación clínica de metástasis hepáticas.

Ejemplo 2: Liofilización

Las nanopartículas desarrolladas se evaluaron con éxito respecto de su capacidad para mantener la asociación al miRNA después de un proceso de liofilización.

REIVINDICACIONES

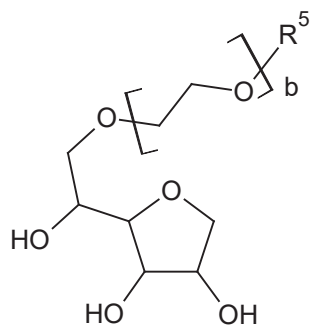
- 5 1. Una nanopartícula que comprende (i) entre un 60% y un 99% en peso, con respecto al peso total de la nanopartícula, de un éster de sorbitán; (ii) una sustancia cargada positivamente; y (iii) un miRNA.
2. La nanopartícula según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sustancia cargada positivamente comprende un grupo amonio o amina unido a uno, dos o tres restos que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄₀, alqueniilo C₂-C₄₀, alquinilo C₂-C₄₀.
- 10 3. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha sustancia cargada positivamente tiene la fórmula (R¹⁰)_p (R¹¹)(R¹²)NR⁹, en donde cada uno de R¹⁰, R¹¹ y R¹² se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo C₁-C₄, alqueniilo C₂-C₄, alquinilo C₂-C₄, y fenilalquilo C₇-C₁₅; R⁹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄₀, alqueniilo C₂-C₄₀, alquinilo C₂-C₄₀; p es 0 o 1;
- 15 y en donde también comprende un contranión en el caso en el que p es 1.
4. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha sustancia cargada positivamente se selecciona del grupo que consiste en oleilamina, cloruro de benzalconio y bromuro de cetil trimetil amonio.
- 20 5. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho éster de sorbitán comprende un compuesto de fórmula I



Fórmula I

- en donde
- 25 cada uno de R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -(C=O)-alquilo C₁-C₄₀, -(C=O)-alqueniilo C₂-C₄₀, -(C=O)-alquinilo C₂-C₄₀, con la condición de que al menos uno de R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ no es -H; cada uno de a, b, c y d es independientemente un número entre 0 y 100.
6. La nanopartícula según la reivindicación 5, caracterizada por que dicho grupo alquilo es lineal y comprende entre 2 y 20 átomos de carbono.
- 30 7. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizada por que dicho grupo alquilo tiene 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono.
8. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 ó 7, caracterizada por que dicho grupo alqueniilo es lineal y comprende entre 4 y 25 átomos de carbono.
- 35 9. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 7 u 8, caracterizada por que dicho grupo alqueniilo tiene la fórmula -(CH₂)_n-CH=CH-(CH₂)_m-CH₃, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10.
10. La nanopartícula según la reivindicación 9, caracterizada por que n es 7 y m es 7.
11. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, caracterizada por que a, b, c y d son 0.
- 40 12. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, caracterizada por que la suma de a, b, c y d se encuentra entre 10 y 30.
13. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, caracterizada por que R⁶, R⁷ y R⁸ son -H.
14. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que dicho éster de sorbitán tiene la fórmula II

ES 2 636 646 B1

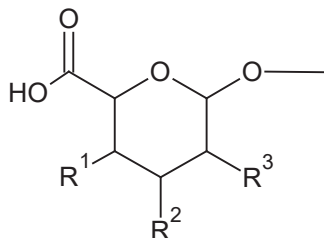


Fórmula II

en donde

R^5 se selecciona del grupo que consiste en $-(C=O)$ -alquilo C_1 - C_{40} y $-(C=O)$ -alqueno C_2 - C_{40} ; y b es un número entre 0 y 100.

15. La nanopartícula según la reivindicación 14, caracterizada por que b es 0; y R^5 tiene la fórmula $-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10.
16. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que tiene un potencial positivo comprendido entre +1 y +100 mV.
17. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada por que comprende una sustancia cargada negativamente.
18. La nanopartícula según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente comprende un polisacárido cuya unidad repetitiva tiene la fórmula $[X-Y-(Z)_n]$ en donde n es 0 o 1; X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; con la condición de que al menos uno de X, Y y Z comprende un azúcar ácido y en donde los grupos X, Y y Z se unen entre sí a través de enlaces $-O$ -glucosídicos.
19. La nanopartícula según la reivindicación 18, caracterizada por que dicho azúcar ácido se selecciona del grupo formado por los ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos y mezclas de los mismos.
20. La nanopartícula según la reivindicación 18, caracterizada por que Y comprende un azúcar ácido.
21. La nanopartícula según la reivindicación 20, caracterizada por que Y comprende un ácido urónico.
22. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 21, caracterizada por que dicho ácido urónico tiene la fórmula III



Fórmula III

en donde

cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, $-OH$, $-O-$, $-OR^4$, $N(H)-R^4$ y $-O-SO_3$, con la condición de que al menos uno de R^1 , R^2 y R^3 sea $-O-$, en donde $-O-$ es el átomo de oxígeno que forma el enlace glucosídico, y en donde R^4 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_4 , alqueno C_2 - C_4 , alquino C_2 - C_4 , $-(C=O)$ -alquilo C_1 - C_4 , $-(C=O)$ -alqueno C_2 - C_4 , $-(C=O)$ -alquino C_2 - C_4 .

23. La nanopartícula según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente es un polisacárido que comprende uno o más grupos carboxílicos.
24. La nanopartícula según la reivindicación 23, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente comprende ácido glucurónico en su estructura repetitiva.
25. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, sulfato de condroitina y goma xantana.
26. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, caracterizada por que tiene un potencial negativo comprendido entre -25 y -40 mV.

27. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho miRNA se selecciona del grupo que consiste en miR-20a, miR-29, miR-652 miR-34a, miR-16 y mezclas de los mismos.
28. La nanopartícula según la reivindicación 27, caracterizada por que dicho miRNA es miR-20a.
- 5 29. Una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
30. Uso de la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, para la fabricación de un medicamento.
31. Uso de la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una indicación que se selecciona del grupo que
- 10 consiste en cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema respiratorio, alteraciones metabólicas y enfermedades vasculares.
32. Uso según la reivindicación 31 para el tratamiento del cáncer.
33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32 para el tratamiento del cáncer colorectal.
34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31, 32 ó 33 para el tratamiento de la metástasis en hígado.
- 15 35. Un procedimiento para la preparación de la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, caracterizado por que comprende (i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán sobre una solución acuosa; en donde dicha solución orgánica o dicha solución acuosa o ambas comprenden una sustancia cargada positivamente; (ii) la etapa de evaporar disolvente orgánico y agua; y (iii) la etapa opcional de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de otras sustancias; en donde un miRNA se incorpora (a) durante la
- 20 etapa (i) como parte de la solución acuosa, (b) en la etapa de incubación (iii), o en ambas etapas (i) y (ii).
36. El procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por que dicha solución acuosa comprende una sustancia cargada negativamente.
37. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 ó 36, caracterizado por que dicho disolvente orgánico es total o parcialmente soluble en agua.
- 25 38. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35, 36 ó 37, caracterizado por que dicho disolvente es un alcohol.



Figura 1

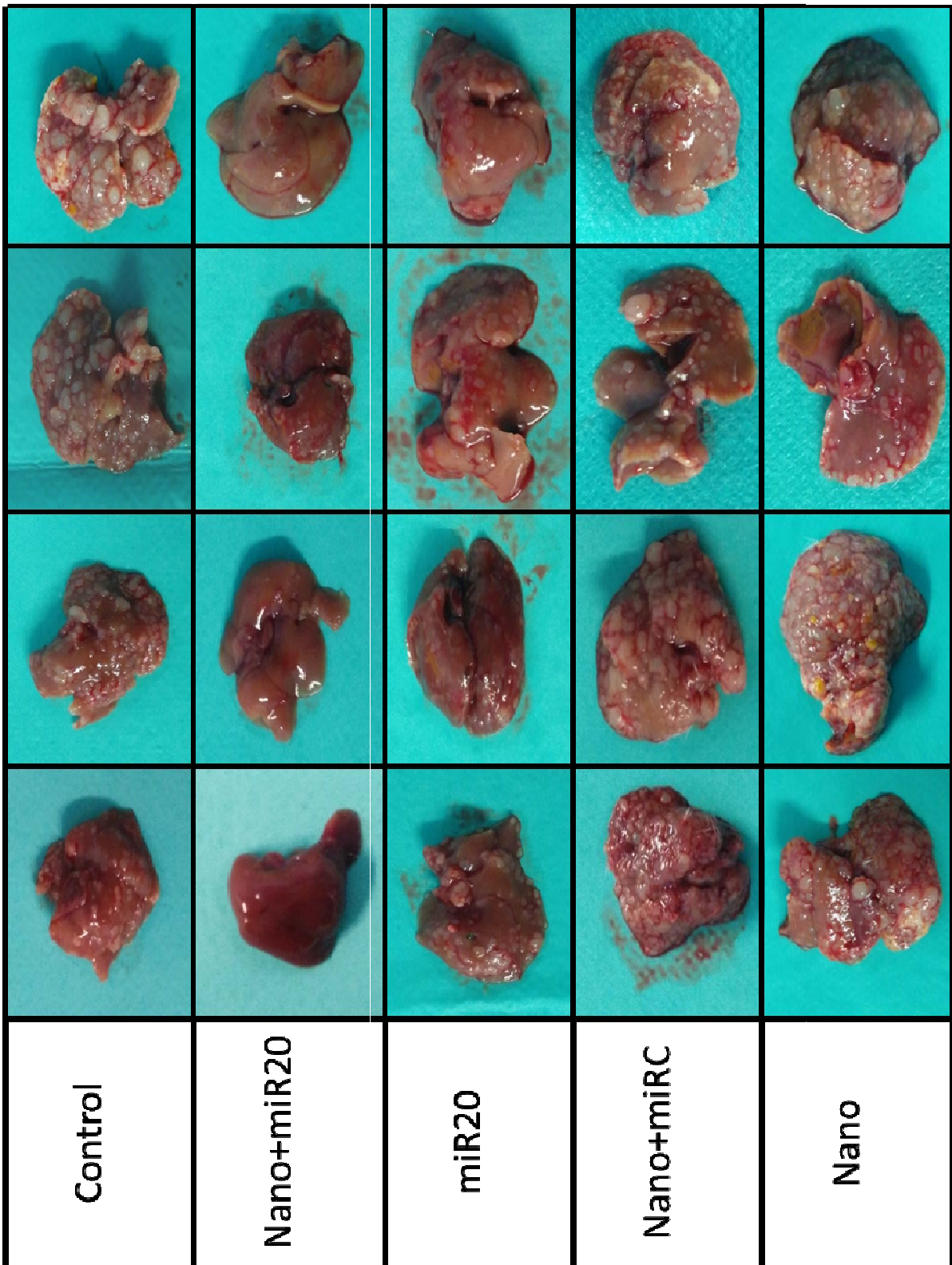


Figura 2

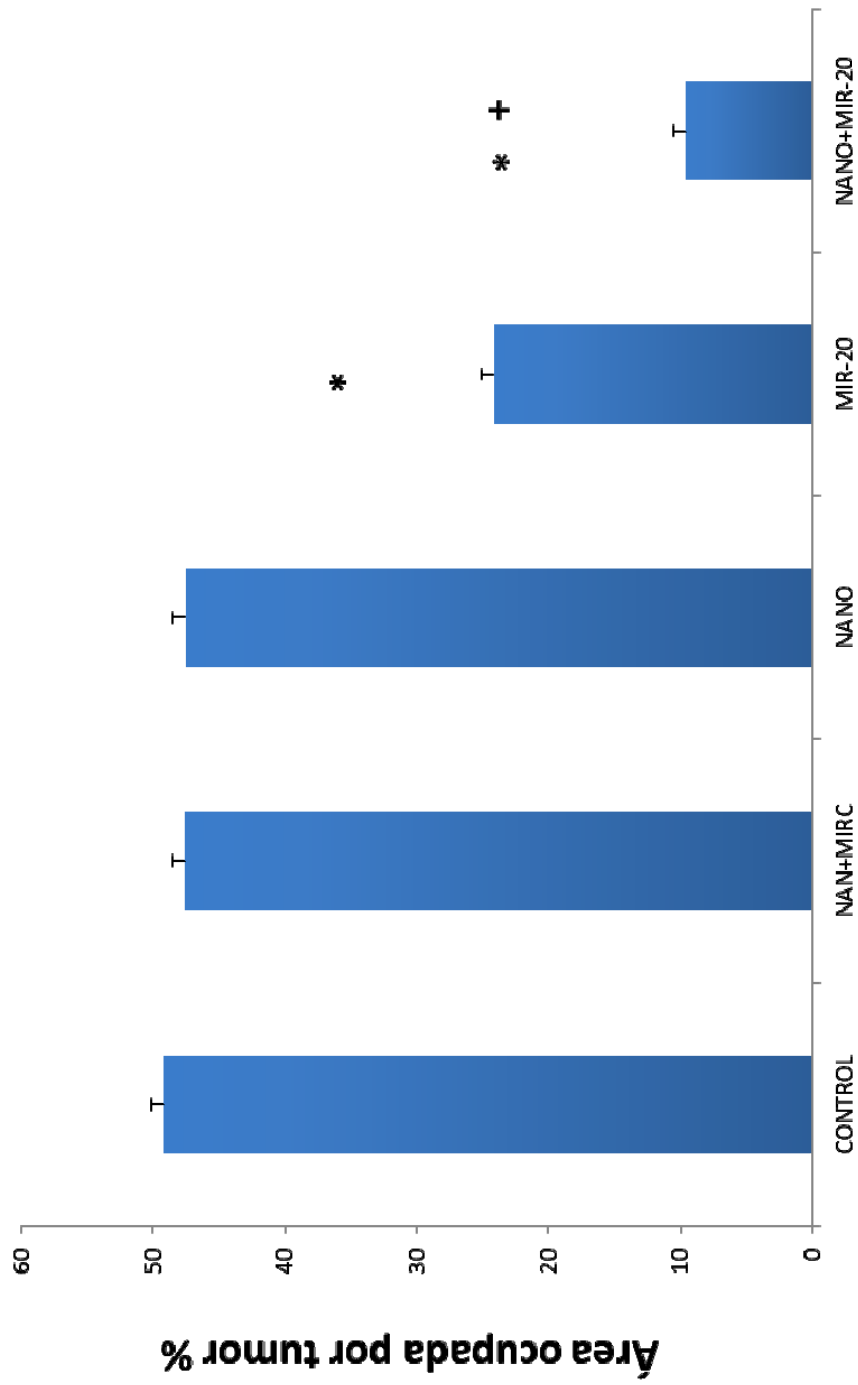


Figura 3



②① N.º solicitud: 201630417

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.04.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | WO 2013/068625 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 16.05.2013, página 1, líneas 4-7; página 6, líneas 12-13; página 9, líneas 25-29; página 10, líneas 7-8; página 11, líneas 14-16; página 12, líneas 4-30; página 13, líneas 5-página 14, línea 25; página 16, líneas 21-22; página 20, líneas 22-23; página 22, líneas 3-13; página 25, línea 15-página 26, línea 7; página 26, líneas 22-34; página 27, líneas 6-15; página 35, ejemplo 5; página 46, ejemplo 14. | 1-26,29-31,35-38 |
| A | ANDRÉ, E.M. et al. "Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease". Biomaterials 2016, Volumen 83, páginas 347-362. [Disponible en línea el 06.01.2016]. Ver página 347, resumen; páginas 355-365, apartados 2.2.2 y 2.3. | 1-38 |
| A | LAM, J. KW. et al. "siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing". Molecular Therapy-Nucleic Acids 2015, Volumen 4, e252. [Disponible en línea el 15.09.2015]. Ver página 1, resumen; página 11, columna 1, párrafo 2-página 13, columna 1, párrafo 1; tablas 4 y 5. | 1-38 |
| A | SHI, S. et al. "Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression". Journal of Controlled Release 2014, Volumen 194, páginas 228-237. [Disponible en línea el 16.09.2014]. Ver página 228, resumen. | 1-38 |
| A | SILVA, A.C. et al. "Lipid Nanoparticles for the Delivery of Biopharmaceuticals". Current Pharmaceutical Biotechnology 2015, Volumen 16, Número 4, páginas 291-302 (12). [Disponible en línea el 01.04.2015]. Ver página 1, resumen; apartado 2.2.2. | 1-38 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.11.2016

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/7105 (2006.01)

B82B1/00 (2006.01)

B82B3/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P35/04 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

A61P11/00 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

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

A61K, B82B, B82Y, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.11.2016

Declaración

| | | |
|---|-------------------------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-38 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 27, 28, 32-34 | SI |
| | Reivindicaciones 1-26, 29-31, 35-38 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | WO 2013/068625 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) | 16.05.2013 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es una **nanopartícula** que comprende un éster de sorbitán, una sustancia cargada positivamente y un **miRNA**; una composición farmacéutica que comprende dicha nanopartícula; el uso de ésta para la fabricación de un medicamento; y un procedimiento para su preparación.

El documento D01, que se considera el estado de la técnica más cercano a la invención, divulga un sistema de vehiculización de sustancias activas de diversa naturaleza, en el que dicha sustancia activa es encapsulada en nanopartículas que comprenden ésteres de sorbitán (ver página 1, líneas 4-7; página 9, líneas 25-29) y que presentan una carga que varía, dependiendo de sus componentes, entre -50 y +60 mV (ver página 11, líneas 14-16). En concreto, las nanopartículas divulgadas comprenden entre el 60 y el 100% de un éster de sorbitán (ver página 10, líneas 7-8), que puede ser un mono-, di-, tri- o sesquioleato, palmitato o estearato (ver página 12, líneas 4-30); una sustancia catiónica, como es bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de benzalconio u oleilamina (ver página 13, líneas 5-24); y, opcionalmente una sustancia aniónica, que se selecciona entre varias posibilidades que incluyen ácido hialurónico, sulfato de condroitina o goma xantano (ver página 13, línea 26-página 14, línea 25; página 16, líneas 21-22). El ingrediente activo que puede incluirse en estas nanopartículas puede ser un ácido nucleico o un derivado de éste, como un plásmido de ADN, ARN de interferencia o un nucleótido (ver página 22, líneas 3-13).

El documento D01 divulga también un procedimiento para la preparación de las nanopartículas a partir de una fase orgánica (utilizando como disolvente, por ejemplo, un alcohol; ver página 26, líneas 22-34), que comprende el éster de sorbitán, que se mezcla con una fase acuosa, pudiendo incluirse las sustancias aniónicas, catiónicas y el componente activo en ambas fases, o bien añadirse en una etapa posterior de incubación de la dispersión formada inicialmente (ver página 25, línea 15-página 26, línea 7; página 27, líneas 6-15).

Además, se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden las nanopartículas descritas (ver página 6, líneas 12-13) y su uso para la preparación de un medicamento (ver página 20, líneas 22-23).

Aunque el documento D01 no divulga explícitamente las nanopartículas que comprenden miRNA y, por ello, la invención es nueva, se considera que el experto en la materia se plantearía, con razonables expectativas de éxito, la incorporación de éste, teniendo en cuenta que en el documento se recogen ejemplos específicos de utilización de RNA interferente (ver, por ejemplo, página 35, ejemplo 5) y ADN plasmídico (ver página 46, ejemplo 14) y se sugiere la posibilidad de utilizar otros tipos de ácidos nucleicos y derivados de éstos.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-26, 29-31, 35-38** no presenta actividad inventiva según lo divulgado en el documento D01 (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986).

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir hacia la invención recogida en las reivindicaciones dependientes **27 y 28**, que se refieren a nanopartículas que comprenden miR-20a, miR-29, miR-652 y miR-20a; ni hacia las reivindicaciones dependientes **32-34**, relativas al uso de las nanopartículas de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **27, 28, 32-34** reúne los requisitos de patentabilidad (novedad, actividad inventiva y aplicación industrial) establecidos en el Artículo 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986).