

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 227**

51 Int. Cl.:

|                     |           |                   |           |
|---------------------|-----------|-------------------|-----------|
| <b>A61K 31/7105</b> | (2006.01) | <b>A61P 25/28</b> | (2006.01) |
| <b>B82B 1/00</b>    | (2006.01) | <b>A61K 47/18</b> | (2007.01) |
| <b>B82B 3/00</b>    | (2006.01) | <b>A61K 47/26</b> | (2006.01) |
| <b>B82Y 5/00</b>    | (2011.01) |                   |           |
| <b>A61P 35/00</b>   | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 35/04</b>   | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 3/00</b>    | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 3/10</b>    | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 9/00</b>    | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 11/00</b>   | (2006.01) |                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2017 PCT/ES2017/070205**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174847**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2017 E 17778723 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.11.2021 EP 3441074**

54 Título: **Vehículos novedosos para la transfección de miARN**

30 Prioridad:

**05.04.2016 ES 201630417**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.04.2022**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO - EUSKAL  
HERRIKO UNIBERTSITATEA (UPV/EHU) (100.0%)  
Barrio Sarriena, S/N  
48940 Leioa, Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ BARREIRO, ALEJANDRO;  
FERNÁNDEZ PIÑEIRO, INÉS;  
BADIOLA, IKER y  
MÁRQUEZ, JOANA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 908 227 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Vehículos novedosos para la transfección de miARN

5 **Campo de la invención**

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

10

**Antecedentes de la invención**

Los microARN, también comúnmente denominados miARN, son secuencias cortas de ARN 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 verificar el potencial de muchos de estos miARN 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 se administran. Los miARN 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 miARN de forma eficiente, evitando su rápida degradación *in vivo*.

20

Una de las primeras estrategias contempladas fue la modificación estructural de los miARN. 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.). Son ejemplos de estas modificaciones la sustitución en esta posición por 2'-fluoro, 2'-O-metilo o 2'-O-metoximetilo, solo por mencionar algunos ejemplos.

25

Otra estrategia seguida ha sido el uso de vectores víricos, por ejemplo, lentivirus o adenovirus, 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, a pesar del hecho de que se han modificado genéticamente para eliminar su carga virulenta, la seguridad de estos vectores siempre despierta preocupación.

30

35

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

40

Un ejemplo es el caso del cáncer colorectal y la metástasis de hígado, una de sus regiones más frecuentes donde se desarrolla la metástasis. Las células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC) juegan un papel clave en el desarrollo y la regulación de la metástasis de hígado. Se ha descubierto que algunos miARN (miR-20a; miR-29 y miR-652) están desregulados en las LSEC y la recuperación de sus niveles normales se presenta como una alternativa terapéutica prometedora. Además, los miARN también se han desvelado como moduladores de la inmunidad y la inflamación. Por lo tanto, la Solicitud Internacional WO2008/147974 A1 proporciona miARN para modular la inmunidad y la inflamación y su uso en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario en mamíferos, por ejemplo, seres humanos, y se refiere además a métodos de detección para identificar compuestos y reactivos útiles en el diagnóstico, la prevención y la terapia de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y la inflamación.

45

50

55

En vista del potencial de los miARN y sus dificultades en la administración, se ha probado el uso de vectores no víricos, por ejemplo, liposomas, péptidos, anticuerpos y otros ligandos, tales como el quitosano. Por lo tanto, se ha buscado la mejora en la transfección de diferentes miARN con los agentes habituales tales como, por ejemplo, los de la familia lipofectamine® (DOTAP, DOTMA o DOPE) o Smarticles® (derivados anfóteros). 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; documento EP2386640) para el tratamiento de mesotelioma pleural maligno. Esta situación contrasta con la de fármacos basados en ARNip, otra familia diferente de ARN 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. También se conoce en la técnica el uso de las nanopartículas en la transferencia o el suministro de ADN. En este sentido, la Solicitud internacional WO 2015/189429 A1 desvela nanopartículas que comprenden un núcleo de éster de sorbitán, una capa superficial de una

60

65

5 sustancia catiónica y una construcción génica que consiste en ADN plasmídico unido físicamente a la sustancia catiónica sobre la superficie de la nanopartícula, esto significa que las nanopartículas están "decoradas" en la superficie de las mismas con el plásmido de ADN, para su uso en un método de tratamiento por transferencia génica o suministro génico en un sujeto mamífero. Sin embargo, la técnica anterior no dice nada sobre el uso de nanopartículas en la transferencia o el suministro de miARN.

10 Dado el reciente interés despertado por los miARN como agentes terapéuticos, existe una necesidad en encontrar y desarrollar nuevos vehículos para una administración más eficaz (LAM, JK, CHOW, MY, ZHANG, Y. y 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 miARN se está viendo especialmente dificultados por ser moléculas de naturaleza hidrófila, alto peso molecular y carga negativa, que impiden su paso a través de la membrana celular.

15 El uso de vectores no víricos mencionados anteriormente 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 efectividad) de muchos de ellos (RINKENAUER, AC, PRESS, AT, 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 fagocíticas tales como los monocitos o los macrófagos, por ejemplo, las células de Kupffer. Aunque se acepta generalmente que existe una correlación entre la superficie cargada positivamente de la nanopartícula y una menor absorción por parte de las células fagocíticas, 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 miARN es por lo tanto de gran interés.

### 30 Breve descripción de la invención

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

40 Por tanto, un primer aspecto de la invención es una nanopartícula que comprende (i) entre un 60 % y un 99 % en peso, basándose en el peso total de la nanopartícula, de un éster de sorbitán; (ii) una sustancia cargada positivamente; (iii) un miARN y (iv) una sustancia cargada negativamente, en donde dicha sustancia cargada negativamente:

- comprende un polisacárido cuya unidad de repetición tiene la fórmula [X-Y-(Z)<sub>n</sub>] en donde:

n es 0 o 1;

45 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 comprenda un azúcar ácido seleccionado del grupo que consiste en ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos y mezclas de los mismos; y en donde los grupos X, Y y Z se enlazan juntos a través de enlaces -O-glucosídicos;

50 o

- es un polisacárido que comprende uno o más grupos carboxílicos.

55 La estabilidad de estos sistemas y la mejora en la transfección de los miARN que proporcionan hacen las nanopartículas desveladas en el presente documento adecuadas para, por ejemplo, aplicaciones en el campo de la farmacia, la cosmética o la nutrición.

60 La presente divulgación también se refiere al uso de una nanopartícula de la invención para la preparación de un fármaco. También es un aspecto adicional una nanopartícula de la invención para su uso como un fármaco.

65 La presente divulgación se refiere además al el uso de una nanopartícula de la invención para preparar un fármaco para el tratamiento de una indicación que se selecciona del grupo que consiste en cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas. Además, un aspecto es 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 ventaja de la invención es que las nanopartículas desveladas en el presente documento son de fácil preparación

y la incorporación de los miARN puede realizarse 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 de esta manera flexibilidad en su preparación. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es un método 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 en donde la dicha solución acuosa comprende además una sustancia cargada negativamente como se define anteriormente; 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 miARN 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.

## 15 Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Gel de electroforesis que confirma la existencia de una asociación eficaz entre un miARN y las nanopartículas preparadas en el Ejemplo 1. 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 SP80-OA-CS-miR-20a de acuerdo con la invención. 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 posteriormente 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 (de acuerdo con la invención) con SP80-OA-CS-miARN-20a; el grupo 3 con miARN-20a libre, sin ningún vehículo específico; el grupo 4 con una nanopartícula SP80-OA-CS asociada a un miRControl (un miARN que no ataca ninguna diana); el grupo 5 con nanopartículas SP80-OA-CS sin ningún miARN. La evaluación macroscópica de los hígados confirmó el efecto terapéutico en términos de regulación clínica en los animales tratados con SP80-OA-CS-miARN-20a (grupo 2).

**Figura 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 la prueba de la T. Las diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) se marcan con \*. También se comparó el grupo 2 (tratados con SP80-OA-CS-miARN-20a) con el grupo 5 (tratados con SP80-OA-CS sin miARN) y su diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) se indica con un +.

**Figura 4.** Gel de electroforesis que confirma la existencia de una asociación eficaz entre un miARN o un plásmido (pEGFP) y las nanopartículas preparadas en el Ejemplo 2. 1) banda correspondiente a pEGFP libre (200 µg/ml), 2) banda correspondiente a nanopartículas asociadas a pEGFP 200 µg/ml, 3) banda correspondiente a miR-20a libre (5 µg/ml), 4) banda correspondiente a nanopartículas asociadas a miR-20a 50 µg/ml (de acuerdo con la invención), 5) banda de la mezcla de nanopartículas y miR-20a 100 µg/ml (no asociados).

**Figura 5:** Imágenes de MET de nanopartículas. 1) Nanopartículas SP-OA-CS del blanco, 2) Nanopartículas cargadas con pEGFP, 3) nanopartículas cargadas con miR-20a.

**Figura 6:** Capacidad de migración de LSEC (Ejemplo 3). El \* refleja la significación estadística, la diferencia entre LSEC sanas en comparación con LSEC de hígado colonizado por el tumor; y + indica la significación estadística de la diferencia entre LSCE de hígado colonizado por el tumor y LSCE de hígado colonizado por el tumor pero transfectado con miR-20a. En ambos casos se usó un umbral de  $p < 0,05$ .

**Figura 7.** Demostración del efecto terapéutico *in vivo* para la segunda prueba de concepto (Ejemplo 4). Análisis histológico. Se tiñeron con hematoxilina-eosina secciones de los hígados evaluados 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 la prueba de la T. Las diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) se marcan con un \*. También se comparó el grupo 2 (tratados con SP80-OA-CS-miARN-20a) con el grupo 5 (tratados con SP80-OA-CS sin miARN) y su diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) se indica con un +.

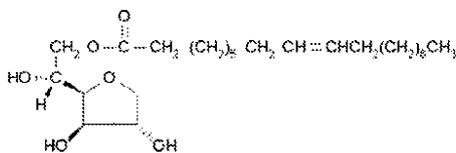
**Figura 8:** El análisis de transferencia Western de ARHGAP1 y E2F1 valida el papel de miR-20a en el patrón de expresión de dos de las dianas predichas. Se realizaron análisis en 5 condiciones diferentes: i) LSEC de hígados sanos, ii) LSEC de hígados colonizados por el tumor, iii) LSEC de hígados colonizados por el tumor y tratadas con el vehículo de transfección Mirus, iv) LSEC de hígados colonizados por el tumor y transfectados con miARN no específico de control y v) LSEC de hígados colonizados por el tumor y transfectados con miR-20a.

## 60 Descripción detallada

### Definiciones

Para la nomenclatura de las nanopartículas de la invención se usa la fórmula [éster de sorbitán]-[sustancia cargada positivamente]. Si la nanopartícula tiene una sustancia cargada negativamente, se indica a continuación separado por un guion. En algunos casos, se indica al final el nombre del miARN usado. Además se usan las siguientes abreviaturas:

SP80: significa 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®

5

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

CS: sulfato de condroitina. Su estructura y propiedades se explican a continuación con mayor detalle.

HA: ácido hialurónico. Su estructura y propiedades se explican a continuación con mayor detalle.

10 Así, por ejemplo, una nanopartícula que se abrevia SP80-OA-HA-miR-20α, será una que incorpora Span-80®, oleilamina, ácido hialurónico y miR-20α, preparada de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

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

15

20 "Alquilo" significa una cadena de hidrocarburo 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 de -ORb, -SRb, -NRaRb, -C(O)Rb, -CO<sub>2</sub>Rb, -C(O)NRaRb, -NRaC(O)Rb, NRaC(O)ORb, -NRaC(O)NRaRb, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>; donde Ra y Rb se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.

25

"Alquenilo" significa una cadena de hidrocarburo 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 de -ORb, -SRb, -NRaRb, -C(O)Rb, -CO<sub>2</sub>Rb, -C(O)NRaRb, -NRaC(O)Rb, -NRaC(O)ORb, -NRaC(O)NRaRb, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>; donde Ra y Rb se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.

30

"Alquinilo" significa una cadena de hidrocarburo 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 de -ORb, -SRb, -NRaRb, -C(O)Rb, -CO<sub>2</sub>Rb, -C(O)NRaRb, -NRaC(O)Rb, -NRaC(O)ORb, -NRaC(O)NRaRb, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>; donde Ra y Rb se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.

35

Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes en peso que se indican en el presente texto se calculan basándose en 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-20α, 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-20α añadidos para la preparación de la nanopartícula. Cuando se usa la partícula "un" o "una" debe entenderse como "al menos un(a)" o "un(a) o más". Por ejemplo, "un miARN" indica que el número de miARN presentes es al menos 1, pero que pueden existir mezclas de 2 o más miARN.

45

### **Componentes de las nanopartículas de la invención**

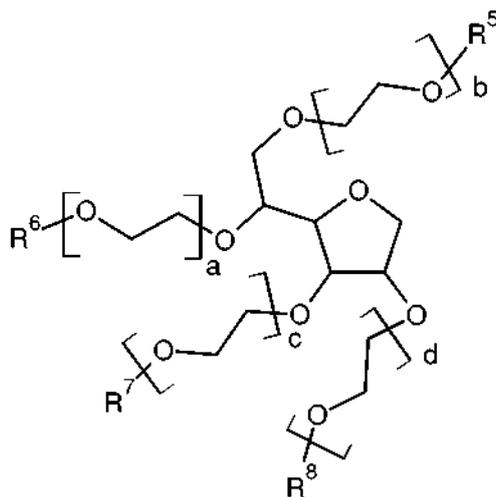
Las nanopartículas de la invención comprenden ésteres de sorbitán. El sorbitán está constituido por una mezcla de anhídridos cíclicos del sorbitol, tales como, por ejemplo, 1,4-anhidrosorbitol, 1,5-anhidrosorbitol y 1,4,3,6-dianhidrosorbitol. Los ésteres de sorbitán se consideran tensioactivos no iónicos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

50

"Ésteres de sorbitán" significa los derivados esterificados del sorbitán donde los grupos éster poseen un sustituyente seleccionado de alquilo, alquenilo y alquinilo. 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-"). Por lo tanto, por ejemplo, el monooleato de sorbitán es el éster de sorbitán que resulta de la esterificación de un grupo hidroxilo con ácido oleico; el trioleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultante de la esterificación de tres grupos hidroxilo del sorbitán con ácido oleico. Existen muchos tipos diferentes de ésteres de sorbitán basándose en el número de hidroxilos esterificados, la estructura del éster, la mezcla de anhidrosorbitol, y otros factores.

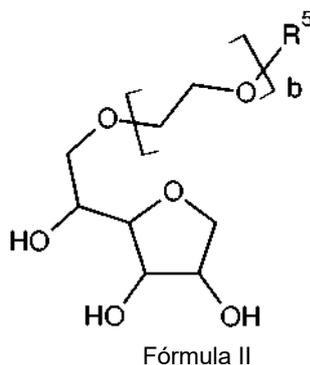
60

- Los ésteres de sorbitán comúnmente usados son, por ejemplo, aquellos disponibles en el mercado con el nombre Span® (sin bloques de polioxietileno) o Tween® (con bloques de polioxietileno). Por mencionar algunos ejemplos, ésteres de sorbitán comunes de la familia Span® 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). Los ésteres de sorbitán de la familias Tween® comunes son el Tween® 20 (monolaurato de sorbitán de polioxietileno), Tween® 40 (monopalmitato de sorbitán de polioxietileno), Tween® 60 (monoestearato de sorbitán de polioxietileno) o Tween® 80 (monooleato de sorbitán de polioxietileno).
- La formación de las nanopartículas desveladas en el presente documento puede comprender mezclas de dos o más ésteres de sorbitán diferentes, tales como 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 desveladas en el presente documento, el experto en la materia puede elegir por tanto diversos ésteres de sorbitán para combinar con la sustancia cargada positivamente y, a modo de ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en monooleato de sorbitán, dioleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, sesquioleato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, dilaurato de sorbitán, trilaurato de sorbitán, sesquilaurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, diestearato de sorbitán, tristearato de sorbitán, sesquiestearato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, dipalmitato de sorbitán, tripalmitato de sorbitán, sesquipalmitato de sorbitán y combinaciones de los mismos.
- Teniendo en cuenta que dichos ésteres de sorbitán opcionalmente comprenden bloques de polioxietileno, el éster de sorbitán usado en las nanopartículas de la invención puede ser un compuesto de fórmula I



Fórmula I

- en donde  
 cada uno de R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -(C=O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>40</sub>, -(C=O)-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, -(C=O)-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, con la condición de que al menos uno de R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> 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 disponibles en el mercado 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 alquenilo lineal que comprende entre 4 y 25 átomos de carbono. Por lo tanto, un ejemplo puede ser un grupo alquenilo de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>, donde n es un número entero entre 1 y 10 y m es un número entero entre 1 y 10. Uno comúnmente usado es uno en el que n es 7 y m es 7, correspondiente al ácido oleico. Como puede verse, 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 (monooleato de sorbitán de polioxietileno) a, b, c y d suman 20.
- De acuerdo con una realización preferida, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> 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



en donde

5

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

10

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

15

La proporción de ésteres de sorbitán en las nanopartículas de la invención se sitúa entre el 60 % y el 99 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula. Las proporciones típicas de ésteres de sorbitán son entre el 80 % y el 98 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula, por ejemplo, entre el 85 % y el 95 %. La proporción de los ésteres de sorbitán es habitualmente mayor del 87 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula.

20

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

25

El polímero catiónico puede seleccionarse del grupo que consiste en protamina, ácido poliglutámico, dextrano cationizado, pululano cationizado, poliaminoácidos, proteínas cationizadas y sales de los mismos. Los poliaminoácidos son otra familia de sustancias cargadas positivamente que pueden usarse 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 derivados cationizados de los mismos.

30

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  $C_1$ - $C_{40}$ , alquenilo  $C_2$ - $C_{40}$ , alquinilo  $C_2$ - $C_{40}$ , 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. Las 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. Por lo tanto, dicha sustancia cargada positivamente puede tener la fórmula  $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$ , donde

35

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

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

$p$  es 0 o 1;

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

45

Otro componente esencial de las nanopartículas de la invención es una sustancia cargada negativamente. De acuerdo con la presente invención, la familia de sustancias cargadas negativamente puede ser un polímero aniónico, significando polímero aniónico un polímero con una carga negativa. La sustancia cargada negativamente puede añadirse en proporciones que varían del 1 % al 39 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula. Las cantidades preferidas varían entre el 2 % y el 20 %, normalmente entre el 3 % y el 12 % o entre el 2 % y 9 % o entre el 3 % y el 8 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula.

50

Estas sustancias son conocidas por una persona experta en la materia y, para la presente invención, dicha sustancia

cargada negativamente:

- comprende un polisacárido cuya unidad de repetición tiene la fórmula  $[X-Y-(Z)_n]$  en donde:

5 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 comprenda un azúcar ácido seleccionado del grupo que consiste en ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos y mezclas de los mismos; y

10 en donde los grupos X, Y y Z se enlazan juntos a través de enlaces -O-glucosídicos;

o

- es un polisacárido que comprende uno o más grupos carboxílicos.

15

Los investigadores han descubierto 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 fagocitosis por las células de Kupffer) y las nanopartículas mejoran la capacidad de transfección del miARN transportado. Esto es contrario a las observaciones descritas en la bibliografía en la que se establece una correlación positiva entre la carga negativa y una fagocitosis aumentada por las células de Kupffer.

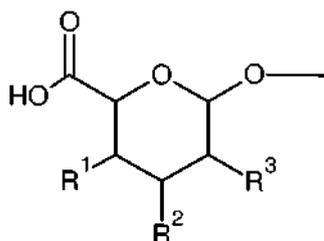
20

Los polímeros aniónicos son preferentemente polisacáridos. Existe una amplia diversidad de estos polisacáridos a disposición del experto en la materia y se usan frecuentemente en este campo. Una diversidad preferida son aquellos que contienen un grupo carboxilo (-COOH) o sulfato (-SO<sub>3</sub>H) en el monómero de repetición. Se han mostrado especialmente adecuados para la presente invención aquellos polisacáridos que tienen al menos un ácido glucurónico en la estructura de repetición. Por ejemplo, dicha sustancia cargada negativamente puede comprender un polisacárido cuya unidad de repetición tiene la fórmula  $[XY-(Z)_n]$  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 comprenda 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 que consiste en 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 limitante de dicho ácido uránico puede ser uno de la fórmula III

25

30

35



Fórmula III

donde

40

cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -O-, -OR<sup>4</sup>, N(H)-R<sup>4</sup> y -O-SO<sub>3</sub>, con la condición de que al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> sea -O-,

en donde los -O- forman los enlaces glucosídicos y

45

en donde R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, -(C=O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, -(C=O)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, -(C=O)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>. Los ejemplos no limitantes de sustancias cargadas negativamente que tienen esta fórmula se seleccionan del grupo que consiste en ácido hialurónico, sulfato de condroitina y goma xantana.

50

Las sustancias cargadas negativamente que se incorporan a las nanopartículas de la presente invención también pueden ser aquellas que seleccionadas del grupo que consiste en ácido hialurónico, ácido colominico, ácido polisialico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenanos, furcelaranos, alginatos, agar, glucomanano, goma gelano, goma garrofin, goma guar, goma tragacanto, goma arábica, goma xantana, goma karaya, pectinas, celulosas, almidones y sales, fragmentos, derivados y mezclas de los mismos.

55

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, enlazados alternando enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glucosídicos. En el contexto de la presente invención, puede usarse ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos

moleculares. El ácido hialurónico de alto peso molecular está disponible en el mercado, mientras que el ácido hialurónico de bajo peso molecular puede obtenerse mediante la fragmentación del ácido hialurónico de alto peso molecular, usando, por ejemplo, una enzima hialuronidasa. Las expresiones "hialurónico, ácido hialurónico, hialuronano" como se usan en la presente descripción incluyen bien el ácido hialurónico o bien una base conjugada del mismo (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina del ácido hialurónico que incluye 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, siendo preferentemente dichas sales farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la invención, la sal alcalina es la sal de sodio del ácido hialurónico.

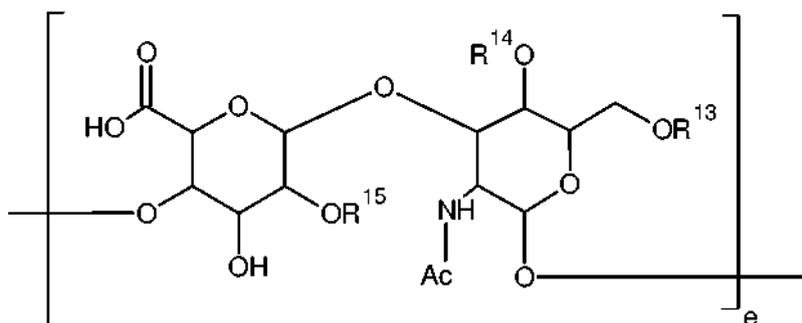
- 5
- 10 La familia de los ácidos polisialícos, una expresión que incluye al ácido colomínico, se encuentra integrada por polímeros lineales formados por restos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac; también conocido como ácido siálico), un constituyente natural de células y tejidos, enlazados por enlaces  $\alpha$ -(2→8) glucosídicos. Cada resto de ácido N-acetilneuramínico tiene 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).
- 15

El sulfato de dextrano es un glucano complejo (polisacárido) que consiste en 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 bien conocidos por un experto en la materia.

- 20
- La heparina es una sustancia de origen natural de la familia de los glucosaminoglucanos cuya estructura química comprende la repetición de unidades monoméricas de disacárido de ácido 2-O-sulfo-L-idurónico y 2-desoxi-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 todos los vertebrados. Ambos tipos de heparina pueden usarse en forma de base libre o en forma de sal, tal 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. Los ejemplos de este tipo de heparinas son enoxaparina, pamaparina, dalteparina y nadroparina, así como sales de las mismas, tales como las sales de sodio y calcio. Los derivados de heparina también pueden usarse en la composición de los sistemas 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.
- 25
- 30

Por lo tanto, las heparinas N-acetiladas, O-descarboxiladas, oxidadas o reducidas son ampliamente conocidas.

- 35
- 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 proteoglucano. En el contexto de la presente invención, la expresión "sulfato de condroitina" incluye todos sus diferentes isómeros y derivados, así como combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se selecciona de las siguientes sustancias y combinaciones de las mismas, resumidas en la fórmula IV
- 40



IV

- 45
- 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 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.

50

  - 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<sub>3</sub>H);

- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina (R<sup>13</sup>=SO<sub>3</sub>H, R<sup>14</sup>= SO<sub>3</sub>H y R<sup>15</sup>=H); y

5 en donde "e" representa el número de repeticiones del monómero, es decir, su nivel de polimerización.

La expresión "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,  
10 se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los 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-dialquilen-etanolamina, trietanolamina, glucamina básica y aminoácidos básicos. Preferentemente las sales son farmacéuticamente aceptables.

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

20 La carragenina o carragenano está formada por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa sulfatada o no sulfatada enlazadas por enlaces alternos -1,3 y -1,4. Dependiendo del nivel 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 alcance de la presente invención.

25 El glucomanano es un polisacárido hidrosoluble de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica lineal con una pequeña proporción de ramificaciones. Específicamente, consiste en unidades de D-manosa y D-glucosa enlazadas por enlaces -1,4 en una proporción de 1,6:1, respectivamente. En una realización particular de la invención, el glucomanano usado es un derivado de glucomanano con carga negativa seleccionado de los derivados fosforilados carboximetil y dicarboxi-glucomananos.

30 La goma gelano es un polisacárido hidrosoluble de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica formada por unidades de α-L-ramnosio, ácido β-D-glucurónico y dos unidades de β-D-glucosa. El polímero puede estar en forma parcialmente acetilada. Dependiendo de su nivel de acetilación, la goma gelano proporciona geles con diferentes propiedades mecánicas. En el contexto de la presente invención, la expresión "goma gelano" incluye todos sus diferentes derivados, así como combinaciones de los mismos. Sin querer estar  
35 limitado por la teoría, los presentes inventores piensan que las nanopartículas de la invención son estructuras homogéneas sólidas en las que los miARN son adsorbidos. Esto es contrario a los sistemas usados para transportar miARN que se han usado hasta ahora. Como ya se ha mencionado anteriormente, los que se están usando ahora para la realización de ensayos clínicos de miARN usan liposomas o vesículas, es decir, estructuras de bicapa lipídica que encierran en su interior una fase acuosa. Los miARN quedan unidos a la estructura sólida que forman los ésteres  
40 de sorbitol y la sustancia cargada positivamente.

El tamaño promedio de las nanopartículas de la invención es de entre 1 y 999 nanómetros y pueden tener un potencial negativo. De acuerdo con una realización preferida, la nanopartícula de la invención tienen un potencial negativo comprendido entre -25 mV y -40 mV.

45 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 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-. Dicho derivado de óxido de etileno puede ser un compuesto de fórmula R<sup>16</sup>O[CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O]<sub>f</sub>-C(H)(R<sup>17</sup>)(R<sup>18</sup>), donde R<sup>17</sup> es un grupo carbonilo o hidrógeno; R<sup>18</sup> es un grupo alquilo, alquenilo o alquínilo, de entre 2 a 24 átomos de carbono; R<sup>16</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo de entre  
50 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. Los ejemplos de derivados de óxido de etileno, sin limitarse a los mismos, 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-hidroxietil octadecanoato (Myrj 52) y monoestearato de etilen glicol.

55 Los derivados de óxido de etileno pueden incorporarse en proporciones que varían entre el 0,1 % y el 20 % en peso basándose en el 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, basándose en el peso total de la nanopartícula.

## 60 **Aplicaciones y miARN**

El otro componente esencial de las nanopartículas de la invención es un miARN o una mezcla de miARN, los cuales se suelen encontrar en proporciones por debajo del 25 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula. La proporción en la que se encuentran en cada caso puede ajustarse y puede ser, por ejemplo de entre el 0,01 y el 10 %  
65 o entre el 0,2 % y el 3 % en peso basándose en el peso total de la nanopartícula. Los miARN que se usan en las nanopartículas de la invención son moléculas de ARN que normalmente comprenden entre 5 y 30 bases o entre 15 y

25 bases.

Los miARN y, por lo tanto, también las nanopartículas desveladas en el presente documento, tienen múltiples aplicaciones, por ejemplo, en el campo farmacéutico, cosmético o de la nutrición. Así, por ejemplo, se estudia en la actualidad la aplicación terapéutica de diversos miARN en campos tales como el cáncer (miARN-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 miARN es el del cáncer. Por lo 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 cáncer colorrectal, mesotelioma pleural maligno, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de colon y metástasis hepática y de pulmón.

Por otro lado, se han identificado las proteínas ARHGAP1 y E2F1 como dianas del miR-20a, por lo tanto, el uso de las nanopartículas desveladas en el presente documento para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad mediada por ARHGAP1 y/o E2F1 es otro aspecto de la divulgación. La sobreexpresión de E2F1 está relacionada con glioblastoma, cáncer de páncreas, melanoma y cáncer de testículos y la de ARHGAP con el cáncer de mama. Por lo tanto, las partículas de la invención también son útiles para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una afección que se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de testículos y cáncer de mama.

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 afección. También abarca la prevención, reducción o eliminación de las secuelas de dicha enfermedad o afección, o de los efectos secundarios o adversos provocados por otro fármaco usado. También abarca la administración para mantener la salud en sujetos en riesgo de padecer esta enfermedad. El término "reducir" significa cualquier mejora en la situación del paciente, medida por parámetros subjetivos (por ejemplo, percepción del paciente) o parámetros 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 descubierto que permiten reducir o eliminar la metástasis y los efectos de dicha metástasis de hígado que acompaña muchas veces al cáncer colorrectal, 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 los mismos, preferentemente miARN-20a, para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal y/o su metástasis de hígado asociada.

Otro aspecto de la presente divulgación 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 usado 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 usado 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 las afecciones anteriormente mencionadas 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 lo 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. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa 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 seres humanos. Preferentemente, como se usa en el presente documento, la expresión "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" significa 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 fisicoquímicas del fármaco 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 usan preferentemente como vehículos agua o soluciones acuosas salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol o de glucosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

La composición farmacéutica o fármaco puede encontrarse en cualquier forma adecuada para su administración a seres humanos y/o animales, preferentemente seres humanos, incluyendo bebés, niños y adultos y puede prepararse por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. El fármaco puede prepararse por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, reflejados en "Pharmaceutics:

The Science of Dosage Forms, segunda edición, Aulton, M.E. (ed.) Churchill Livingstone, Edimburgo (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). La composición del fármaco puede variar dependiendo de la vía de administración. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de dichas formas de dosificación farmacéuticas de la composición farmacéutica de la invención incluyen formulaciones orales o bucales (líquidas, solución, suspensión, emulsión, gel, pasta, polvo, liofilizado oral, comprimidos, cápsulas, píldoras, emulsiones); formulaciones sublinguales; formulaciones oftálmicas; formulaciones para el oído (ótic); formulaciones tópicas; formulaciones nasales; formulaciones rectales; formulaciones vaginales; formulaciones intrauterinas; formulaciones para inhalación o pulmonares; formulaciones parenterales, por ejemplo, formulación inyectable, 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, un método que no requiere inyección u homogeneización. En general, el método de la invención comprende (i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán a una solución acuosa, en donde dicha solución orgánica o dicha solución acuosa o ambas comprenden una sustancia cargada positivamente y en donde la dicha solución acuosa comprende además una sustancia cargada negativamente como se define en la presente divulgación; (ii) la etapa de evaporar el disolvente, es decir, el disolvente orgánico, y el agua; y (iii) una etapa opcional de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de otras sustancias; y en donde se incorpora un miARN

- (a) durante la etapa (i) como parte de la solución acuosa,
- (b) en la etapa de incubación (ii) o
- (c) en ambas etapas (i) y (ii).

En caso de que no se incorpore ningún miARN durante la etapa (i), es necesario proceder a la incubación (etapa (iii)) para incorporar el miARN (o los miARN). Por lo tanto, una alternativa es un método que comprende (i) la etapa de añadir una solución que comprende un disolvente orgánico, un éster de sorbitán y una sustancia cargada positivamente a una solución acuosa que comprende un miARN; y (ii) la etapa de evaporar el disolvente, es decir, el disolvente orgánico 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 a una solución acuosa; (ii) la etapa de evaporar el disolvente, es decir, el disolvente orgánico y el agua; y (iii) la etapa de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de un miARN. Los procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO2013/068625.

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

La adición de la fase orgánica se lleva a cabo preferentemente bajo agitación de la fase acuosa. La solución acuosa 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 solución que comprende cualquiera 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 pueden prepararse en una única etapa y adicionalmente tiene la ventaja de que no es necesaria ninguna reacción química a fin de anclar las cadenas de óxido de etileno a la superficie de las nanopartículas. Por lo tanto, en otra realización particular, la fase orgánica comprende además un derivado de óxido de etileno, por ejemplo, uno de fórmula  $R^{16}O[CH_2-CH_2-O]_r-C(H)(R^{17})(R^{18})$  como se describe anteriormente.

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

La concentración 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, la 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, preferentemente 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, preferentemente entre 0,1 y 0,3 mg/ml.

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

Se ha descubierto que las nanopartículas de la invención aguantan sin degradación la liofilización y otros procesos de deshidratación. Por tanto, el método 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 total o parcialmente deshidratado. En el caso de 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.

Por lo tanto, un último aspecto de la invención se dirige a nanopartículas obtenibles como se describió anteriormente.

Los componentes descritos anteriormente pueden combinarse de tal manera que, en cada caso, la nanopartícula de la invención resultante se adapte a la situación concreta, y la presente invención abarca diversas combinaciones de ésteres de sorbitán, sustancias cargadas positivamente, miARN, sustancias cargadas negativamente así como 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 miARN (por ejemplo, miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de los mismos); (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula  $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$ , como se ha descrito anteriormente; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. En otra realización, la presente invención comprende (i) uno o más miARN (por ejemplo, miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de los mismos, o también miR-93 o mezclas del mismo con uno o más de los anteriores); (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente seleccionada del grupo que consiste en CTAB, BZC, oleilamina y mezclas de los mismos; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miARN; (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula  $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$ , como se ha descrito anteriormente; 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 miARN; (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. Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miARN; (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula  $(R^{10})_p(R^{11})(R^{12})NR^9$ , como se ha descrito anteriormente; y (iv) un polisacárido cargado negativamente.

Hay que tener en cuenta que, además del miARN, las nanopartículas de la invención pueden comprender otros componentes, tales 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 usando la técnica de espectroscopia 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 eficiencia de la asociación de los miARN a 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 la 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 miARN libre como control.

Como se usa 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 miARN usados se adquirieron de Exiqon (Dinamarca). Los demás productos indicados en los ejemplos a continuación se adquirieron de Sigma (España).

Para confirmar la validez de las nanopartículas de la invención en una prueba de concepto se realizaron los ensayos

*in vitro* e *in vivo* que se describen a continuación. Con estos ensayos se buscaba, entre otras cosas, confirmar la correcta asociación de los miARN en las nanopartículas, su correcta distribución a las células diana relevantes, y su efecto terapéutico mejorado.

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

#### **Preparación y caracterización de nanopartículas**

10 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 NP. El etanol se retiró finalmente a presión reducida en un evaporador rotatorio. El miARN se incluyó en la fase acuosa a una concentración de 8,33 µg/ml durante la preparación de las nanopartículas. Para este fin, se seleccionó miR-20a. Estas proporciones corresponden a porcentajes en peso basándose en el peso total de la nanopartícula del 91,67 % de SP80, 4,63 % de OA, 3,47 % de CS y 0,23 % de miR-20a.

20 Se midió el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas mediante espectroscopia de correlación fotónica y anometría Doppler láser, respectivamente.

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

| Formulación                         | tamaño (nm)  | Pdl   | Potencial ζ |
|-------------------------------------|--------------|-------|-------------|
| 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 |

#### **Eficiencia de la asociación entre el miARN y la nanopartícula**

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

#### **Manejo de animales:**

30 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 del 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/6NCH (hembras, 8 semanas de edad) a través de Charles River Laboratories España, S.A. Los ratones se alojaron en la Unidad de Recursos Biológicos de la Universidad del País Vasco y se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada ( $21 \pm 1$  °C), humedad relativa del  $55 \pm 5$  %, ciclo de luz/oscuridad de 08:00 a.m. - 08:00 p.m. y se les suministró alimento para ratón convencional y agua a discreción.

40 **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 isoflurano (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 miARN por animal. Los ratones se separaron en 5 grupos diferentes dependiendo del tratamiento. El grupo 1 se trató con placebo (glucosa); el grupo 2, de acuerdo con la invención, se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas a 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 a un miRControl (este miR no ataca a ningún ARNm); el grupo 5 se trató con las nanopartículas SP80-OA-CS en blanco (sin ARNm 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:**

55 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.

60 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 del sinusoides hepático (LSEC) que proporcionan las nanopartículas al miR-20a.

5 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 a miR-20a (Figura 2).

10 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 control (tratado con glucosa como placebo) mediante la prueba de la 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 a miR-20a y con nanopartículas de SP80-OA-CS en blanco (sin ARNm asociado) y la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) se indicó con un +. Como puede verse 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 a miR-20a (de acuerdo con la invención) que en ratones tratados solo con miR-20a.

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

### **Ejemplo 2: Prueba de concepto adicional *in vivo* e *in vitro* del efecto terapéutico y del comportamiento de las nanopartículas de la invención**

#### **Células de Cáncer Colorectal**

25 Se usaron líneas celulares de cáncer colorectal murino c26 (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) singénicas con ratones Balb/c. Las células se cultivaron en condiciones convencionales en medio RPMI (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml), todos adquiridos de Life technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.).

#### **Células de control y activadas por tumor**

30 Se anestesiaron los ratones con isoflurano, y se practicó una pequeña incisión en su costado izquierdo. Después, se inoculó el corte con 50 µl de las células de cáncer C26 en una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. A continuación, se suturó el peritoneo y la piel. Los ratones de control se inocularon con PBS. Catorce días más tarde todos los ratones fueron sacrificados y las líneas celulares activadas por cáncer y las de control se aislaron mediante centrifugación diferencial de gradiente (25 % a 50 %) de Percoll (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). Las líneas celulares se sembraron con medio RPMI 1640 con 10 % FBS, y se realizó la purificación de ARN siguiendo el protocolo de un minikit Purelink RNA (Gibco Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.).

#### **Preparación y caracterización de SP-OA-CS de control, SP-OA-CS asociada a pEGFP y SP-OA-CS asociada a miARN**

45 Siguiendo un esquema análogo al del Ejemplo 1, se prepararon las nanopartículas que se describen a continuación. Se preparó una solución de monooleato de sorbitán (Span 80, SP) y oleilamina (OA) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) en etanol a una concentración de 6,6 y 0,33 mg/ml, respectivamente. Después, esta fase orgánica se añadió con agitación magnética a una fase acuosa que contenía sulfato de condroitina (CS) (Calbiochem, EE.UU.) a una concentración de 0,125 mg/ml, en una relación de volumen de 1:2, respectivamente. Se retiró el etanol a presión reducida en un evaporador rotatorio. Para la encapsulación de material genético, este se incluyó en la fase acuosa durante la construcción de las nanopartículas a concentraciones de 33,3 µg/ml para plásmido de Proteína Verde Fluorescente Potenciada (pEGFP) (Elim Biopharmaceutics, EE.UU.) y 8,33 µg/ml y 16,7 µg/ml para miARN (miR-20 o miR-control) (Exiqon, Dinamarca). Las formulaciones finales obtenidas fueron 200 µg/ml de NP cargadas con pEGFP, 50 y 100 µg/ml de NP cargadas con miARN. Las formulaciones se administraron en una solución de glucosa al 5 % para los estudios *in vivo*. La eficiencia de la asociación del ADN plasmídico y los miARN se determinó mediante la electroforesis en gel de agarosa, con resultados análogos a los del Ejemplo 1, confirmando que la migración de los ácidos nucleicos al gel se evitó mediante su asociación a las nanopartículas; no se observó ningún material genético libre en estas formulaciones (véase la Figura 4). La morfología de las nanopartículas se examinó con microscopía electrónica de transmisión (CM 12 Philips, Eindhoven, Países Bajos) después de teñir con solución de ácido fosfotúngstico al 2 % p/v. Para este fin, las muestras se colocaron en rejillas de cobre (malla 400) recubiertas con una película de Formvar®.

60 Las nanopartículas en blanco (sin material genético incorporado) y las nanopartículas asociadas a pEGFP o a miR-20a tuvieron tamaños nanométricos de 133 nm, 143 nm y 143 nm y cargas de superficies negativas de -38 mV, -36 mV y -33 mV, respectivamente. La morfología de los nanosistemas se observó usando microscopía electrónica de transmisión (MET). Las imágenes de MET confirmaron el tamaño nanométrico de las formulaciones (Figura 5).

**Tabla 2:** Caracterización fisicoquímica de nanopartículas SP-OA-CS asociadas a pEGFP o a miR-20a que son capaces de dirigirse a LSEC *in vitro* e *in vivo*

| Formulación      | Tamaño (nm)      | Pdl   | Potencial $\zeta$ (mV) |
|------------------|------------------|-------|------------------------|
| SP-OA-CS         | 132,9 $\pm$ 4,2  | 0,069 | -38,2 $\pm$ 1,6        |
| SP-OA-CS-pEGFP   | 142,7 $\pm$ 13,8 | 0,091 | -36,4 $\pm$ 8,6        |
| SP-OA-CS-miR-20a | 142,6 $\pm$ 1,4  | 0,065 | -33,3 $\pm$ 3,0        |

**Correcta distribución de las nanopartículas de la invención a las células diana relevantes**

5 Para demostrar la captación celular y capacidad de transfección de nanopartículas SP-OA-CS por LSEC se incorporó un ADN plasmídico que codificaba GFP durante su preparación. La expresión de GFP se evaluó 24 h después de la transfección usando microscopía de fluorescencia. En este momento experimental, las LSEC expresaban GFP, lo que indica la internalización de nanopartículas y suministro exitoso de plásmidos, es decir, la eficaz liberación de material genético a dichas células por parte de las nanopartículas. Para evaluar si las nanopartículas de la invención podrían ser eficaces en LSEC *in vivo*, se inyectaron sistémicamente en ratones SP-OA-CS que contenían plásmido EGFP. Los sinusoides hepáticos expresaron GFP, lo que indica un suministro de plásmido exitoso, es decir, la eficaz liberación de material genético a dichas células por parte de las nanopartículas. Además, las secciones se inmunotizaron con receptor anti-manosa y anticuerpos F4/80. Las células positivas para GFP fueron células endoteliales del sinusoide hepático. La señal de fluorescencia de miR-20a se detectó en LSEC cuando se inyectaron en los ratones nanopartículas asociadas a miARN. Al mismo tiempo, la señal fluorescente era más amplia cuando se inyectó miR-20a en la forma desnuda.

**Ejemplo 3: La capacidad migratoria aumentada de LSEC activadas por señales tumorales se evita por miR-20a**

20 Para verificar si la anulación de miR-20a en el LSEC de hígados colonizados por tumores tuvo alguna consecuencia en el comportamiento fisiológico de estas células, se cultivaron en insertos de poro de 8  $\mu$ m recubiertos con colágeno para medir su capacidad de migración. Las LSEC activadas por tumores se trataron con miR-20a, con miR control o con el vehículo de transfección sin carga Myrus®. Se descubrió que la capacidad de migración LSEC aumentó aproximadamente dos veces cuando las células se activaron por el tumor, pero esto se invirtió casi a niveles basales cuando las células se transfectaron con miR-20a exógeno ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, la restauración de la expresión de miR-20a celular en LSEC fue suficiente para evitar el aumento de capacidad migratoria asociado a la activación inducida por tumor (Figura 6).

**Ejemplo 4: Análisis de desarrollo de metástasis hepática de cáncer colorrectal *in vivo* y tejido hepático histológico**

30 Siguiendo una metodología análoga a la del Ejemplo 1, se anestesiaron ratones Balb/c con isoflurano (Esteve, España) y se realizó un pequeño corte en su lado izquierdo. A continuación, el bazo se expuso para realizar una inoculación intra-esplénica de 50  $\mu$ l de células de carcinoma de colon C26 a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml para cada ratón. Los animales se dividieron en 5 grupos y los tratamientos se realizaron cada 3 días desde el día de la inoculación de células cancerosas. El grupo 1 se trató con placebo (glucosa); el grupo 2, de acuerdo con la invención, se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas a miR-20a; 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 a un miRControl (este miR no ataca a ningún ARNm); el grupo 5 se trató con las nanopartículas SP80-OA-CS en blanco (sin ARNm asociado). Finalmente, los hígados se incluyeron en parafina y se congelaron para análisis histológicos. Para cuantificar el área ocupada por el tumor, se cortaron secciones de 7  $\mu$ m consecutivas con 500  $\mu$ m entre ellas en hígados incluidos en parafina. A continuación, se realizó tinción con hematoxilina y eosina y el área tumoral se cuantificó usando Software ImageJ. Además, para analizar las LSEC infiltradoras potencialmente activadas en el área metastatizada, se realizó inmunotinción con dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal anti-CD31 (BD Pharmingen, EE.UU.), seguido del anticuerpo fluorescente secundario Alexa 594 (1:1000) apropiado. Se cuantificaron las imágenes usando el programa AnalySIS V3.2 (Olympus Software Imagine Solutions GMBH, Munster, Alemania). Los resultados se expresan como un porcentaje de área tisular coloreada específicamente con respecto al área analizada completa. Los resultados se muestran en la Figura 7.

**Ejemplo 5: Las proteínas diana de miR-20a E2F1 y ARHGAP1 estaban reguladas negativamente en LSEC colonizadas por el tumor en relación con LSEC sanas**

55 Se usó la base de datos miRBASE ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) para identificar 713 proteínas como posibles dianas de miR-20a. En paralelo, en un estudio proteómico, se identificaron 174 proteínas que estaban reguladas positivamente en LSEC activadas por tumores en comparación con LSEC control. Cuando se compararon ambos conjuntos de datos, se descubrieron 5 proteínas expresadas de forma coincidente: E2F1, JAK1, ARHGAP1, ACSL4 y DECR1.

60 Se realizó a continuación un análisis de transferencia Western con LSEC activadas por tumores y LSEC activadas por tumores cultivadas con miR20a exógeno. Brevemente, se usaron cultivos de LSEC con tampón RIPA, se separaron a través de electroforesis de SDS-PAGE al 8 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se detectaron E2F1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE.UU.) y ARHGAP1 (Abcam, Cambridge, RU) (1:1000) usando proteína A conjugada con peroxidasa de rábano picante (1:5.000) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). Las bandas se visualizaron usando un kit Femto Super Signal Substrate (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, EE.UU.). Se usó GAPDH como un control de carga de proteínas.

5

En condiciones de control, E2F1 y ARHGAP1 mostraron baja expresión. Sin embargo, después de la activación de LSEC con el tumor, tanto E2F1 como ARHGAP1 se regularon en gran medida positivamente. Cuando las células se transfectaron *in vitro* con miR-20a, la expresión de proteínas se redujo en ambos casos a niveles basales (véase la Figura 8).

10

#### **Ejemplo 6: Liofilización**

Las nanopartículas desarrolladas en el Ejemplo 1 se evaluaron con respecto a su capacidad para mantener la asociación al miARN después de un proceso de liofilización.

15

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende (i) entre un 60 % y un 99 % en peso, basándose en el peso total de la nanopartícula, de un éster de sorbitán, (ii) una sustancia cargada positivamente, (iii) un miARN y (iv) una sustancia cargada negativamente, en donde dicha sustancia cargada negativamente:

- comprende un polisacárido, cuya unidad de repetición tiene la fórmula [X-Y-(Z)<sub>n</sub>], en la que:

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 comprenda un azúcar ácido seleccionado del grupo que consiste en: ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos y mezclas de los mismos;

y en donde los grupos X, Y y Z se enlazan juntos a través de enlaces -O-glucosídicos;

o

- es un polisacárido que comprende uno o más grupos carboxílicos.

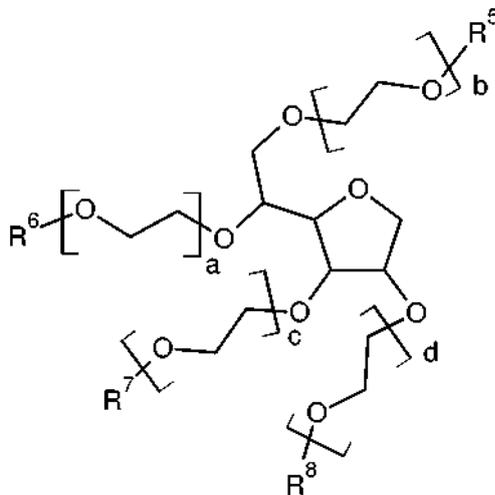
2. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicha sustancia cargada positivamente

- comprende un grupo amonio o amina unido a uno, dos o tres restos que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>40</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>; o

- se selecciona del grupo que consiste en: oleilamina, cloruro de benzalconio y bromuro de cetil trimetil amonio.

3. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dicho éster de sorbitán

- comprende un compuesto de fórmula I:



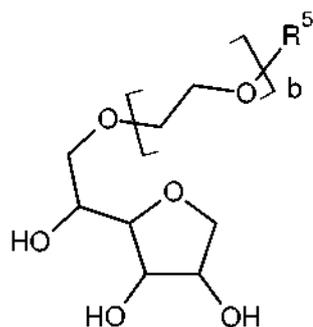
Fórmula I,

en la que

cada uno de R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en: -H, -(C=O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>40</sub>, -(C=O)-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, -(C=O)-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>40</sub>, con la condición de que al menos uno de R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> no sea -H;

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

- tiene la fórmula II:



Fórmula II,

en la que

5

$R^5$  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.

10 4. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** dicha sustancia cargada negativamente se selecciona del grupo que consiste en: ácido hialurónico, sulfato de condroitina, goma xantana y combinaciones de los mismos.

15 5. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** tiene un potencial negativo comprendido entre  $-25$  mV y  $-40$  mV.

6. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho miARN se selecciona del grupo que consiste en: miR-20a, miR-29, miR-652, miR-34a, miR-16 y mezclas de los mismos.

20 7. Una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. La nanopartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como un fármaco.

25 9. La nanopartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como un fármaco para el tratamiento de una indicación que se selecciona del grupo que consiste en: cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del tracto respiratorio, alteraciones metabólicas y enfermedades vasculares.

10. La nanopartícula para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 para el tratamiento de cáncer.

30 11. La nanopartícula para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para el tratamiento del cáncer colorrectal o para el tratamiento de la metástasis en el hígado.

35 12. Un método para la preparación de la nanopartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** comprende:

(i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán a una solución acuosa; en donde dicha solución orgánica o dicha solución acuosa o ambas comprenden una sustancia cargada positivamente y en donde la dicha solución acuosa comprende además una sustancia cargada negativamente como se define en la reivindicación 1;

40 (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;

y en donde se incorpora un miARN:

45 (a) durante la etapa (i) como parte de la solución acuosa,

(b) en la etapa de incubación (iii) o

(c) en ambas etapas (i) y (ii).

50 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** dicho disolvente orgánico es total o parcialmente soluble en agua.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, **caracterizado por que** dicho disolvente es un alcohol.



**Figura 1**

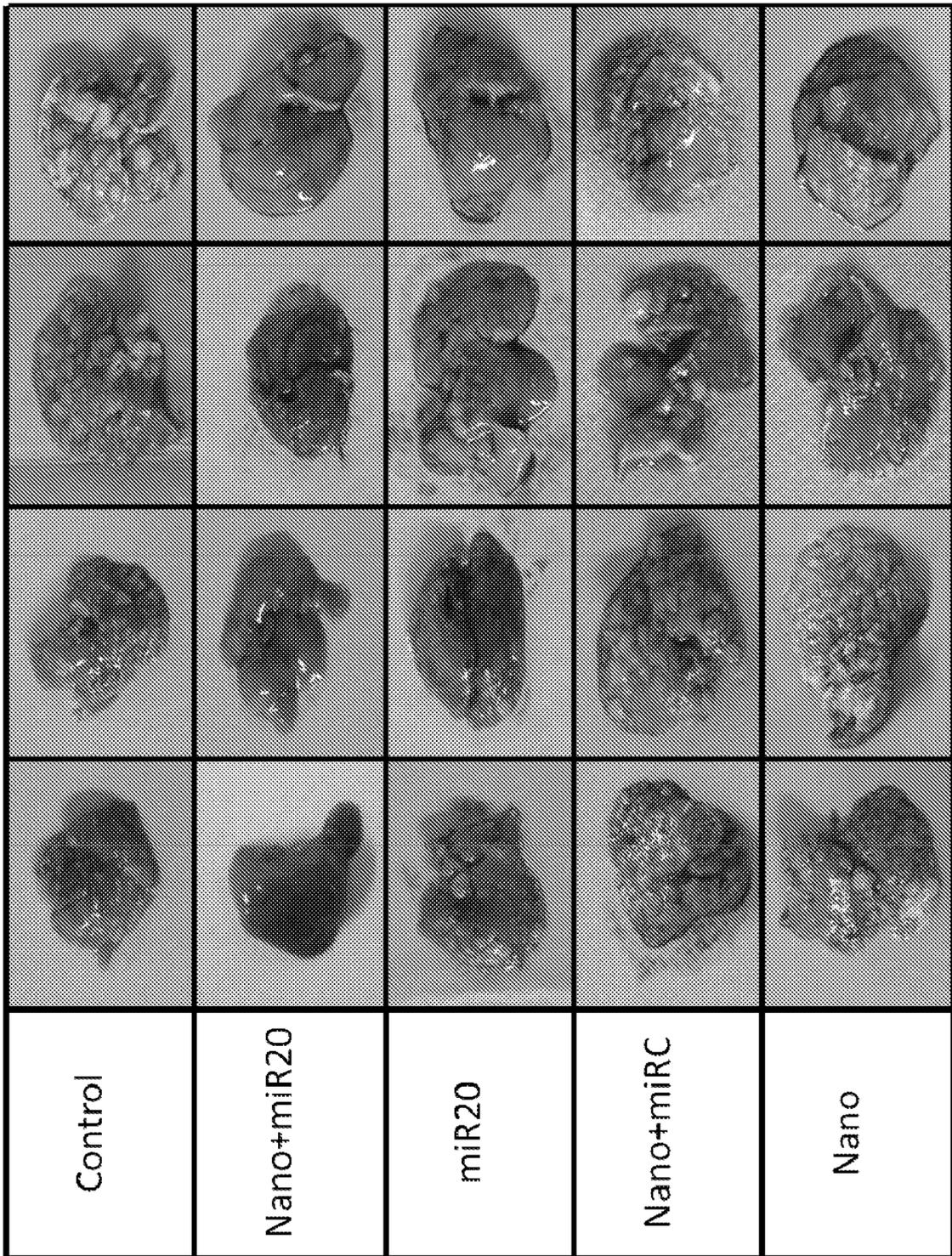


Figura 2

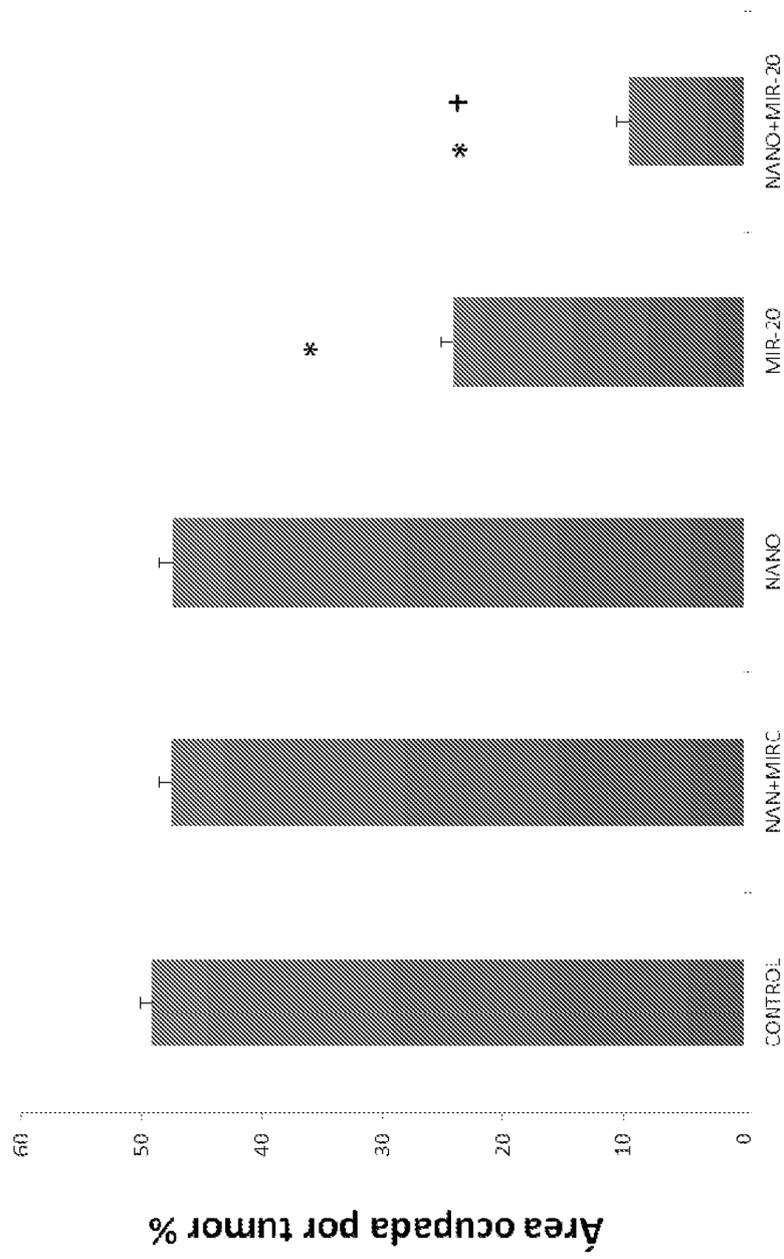


Figura 3

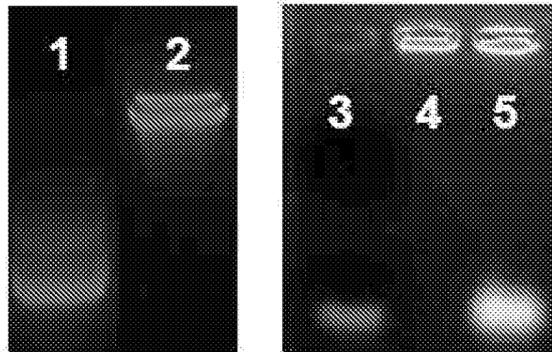


Figura 4

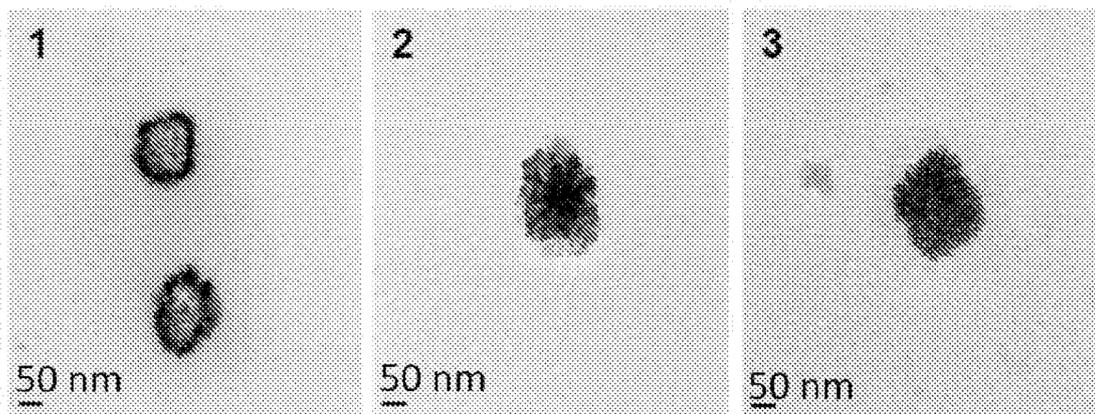


Figura 5

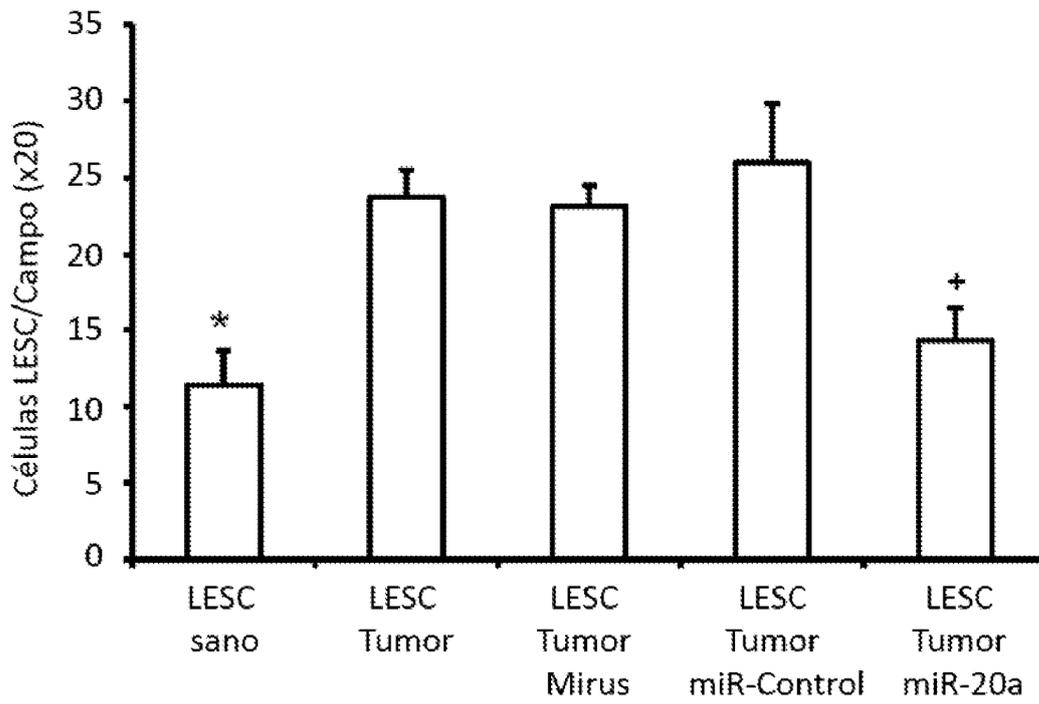


Figura 6

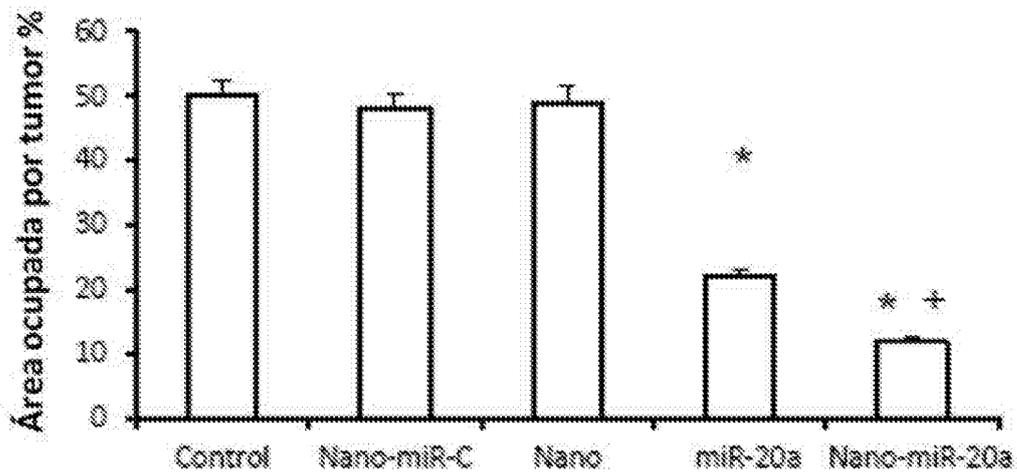


Figura 7

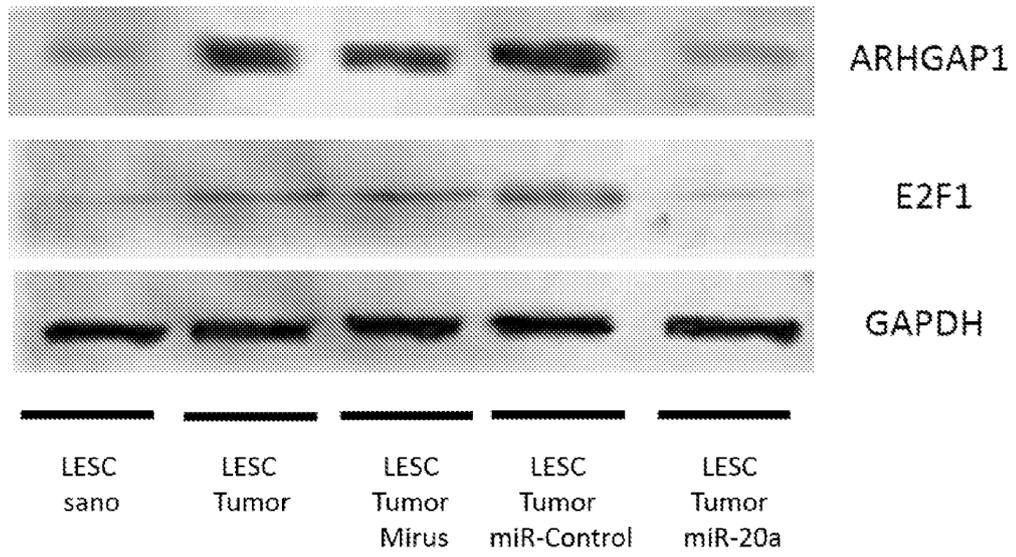


Figura 8