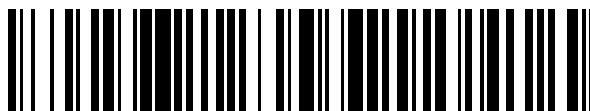


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 073 976**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2020** **PCT/EP2020/087608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2021** **WO21130215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2020** **E 20839047 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2026** **EP 4081196**

54 Título: **Nanopartículas lipídicas de oro para terapia génica**

30 Prioridad:

23.12.2019 EP 19383183

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2026

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (100,00%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**DEL POZO RODRÍGUEZ, ANA;
RODRÍGUEZ GASCÓN, ALICIA;
GÓMEZ AGUADO, ITZIAR;
VICENTE PASCUAL, MÓNICA y
SOLINÍS ASPIAZU, MARÍA ÁNGELES**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 3 073 976 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas lipídicas de oro para terapia génica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la terapia génica. En particular, la invención proporciona nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, por sus siglas en inglés) útiles como vectores para la transfección de ácidos nucleicos, así como métodos para obtener dichas SLN y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas SLN.

Antecedentes

En las últimas décadas se ha desarrollado una amplia gama de reactivos y técnicas para transferir ácidos nucleicos a las células con el propósito de modular la expresión génica tanto *in vitro* como *in vivo*.

10 En particular, se han identificado muchos genes implicados en procesos patológicos y, por tanto, la terapia génica se considera una herramienta terapéutica muy prometedora para revertir alteraciones genéticas en dichas patologías, que incluyen, por ejemplo, enfermedades autosómicas recesivas provocadas por defecto de un solo gen, por ejemplo, fibrosis quística, hemofilia, enfermedad de Fabry; enfermedades autosómicas dominantes; algunos cánceres; VIH y otras enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; o enfermedades oculares tales como retinosquiasis, por nombrar algunas.

15 Con el fin de desarrollar un producto de terapia génica, no sólo hay que tener en cuenta la enfermedad que va a tratarse y el ácido nucleico terapéutico que va a administrarse, sino que también desempeña un papel primordial el método de administración del ácido nucleico, es decir, el sistema de administración del gen. El vector genético empleado debe ser capaz de penetrar la membrana celular de la célula diana, así como de proteger el ácido nucleico frente a la degradación enzimática, y, en última instancia, debe liberar el ácido nucleico en el sitio diana dentro de la célula.

Los sistemas de administración de ácidos nucleicos pueden clasificarse como vectores virales o no virales.

Los vectores virales son los más eficaces, pero tienen grandes problemas de inmunogenicidad y oncogenicidad. Otro inconveniente es que sólo pueden incluir genes de tamaño pequeño.

25 Por tanto, durante los últimos años se ha puesto mucho énfasis en el desarrollo de vectores no virales, que ofrecen una alternativa más segura y más versátil. Entre los diversos vectores génicos no virales, los sistemas basados en lípidos se han propuesto como plataformas prometedoras. Estos sistemas carecen de las proteínas inmunogénicas que se encuentran en los virus y, por lo general, pueden condensar ácidos nucleicos de manera robusta, y, además, suelen ser relativamente sencillos de preparar. Sin embargo, su eficacia de transfección o el nivel de expresión

30 génica que proporcionan todavía es, por lo general, sustancialmente inferior al de los vectores virales.

En las últimas dos décadas se han desarrollado distintos tipos de sistemas de transfección basados en lípidos.

Los liposomas se introdujeron como portadores para la administración de ácidos nucleicos para terapia génica hace más de dos décadas y hasta la fecha siguen representando los vectores más ampliamente estudiados para la administración génica. Los liposomas usados para la administración génica suelen ser nanométricos y están

35 definidos por una vesícula esférica con una cavidad interna acuosa encerrada por una membrana bicapa lipídica. Sin embargo, estos sistemas no están exentos de problemas de estabilidad y eficacia.

Más recientemente se desarrollaron nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) con el objetivo de abordar los problemas mencionados anteriormente que subyacen a la transfección génica por liposomas, entre otras cosas. Si bien comparten un componente lipídico, las SLN están estructuralmente distantes de los liposomas. Las SLN son

40 partículas esféricas que poseen una matriz de núcleo lipídico sólido que está estabilizada por tensioactivos. Dependiendo de la selección de los componentes lipídicos y tensioactivos, así como del método de preparación, las SLN pueden usarse para albergar fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos. La patente europea EP 2460516 B1, de los presentes inventores, describe SLN adecuadas como vectores de terapia génica.

A pesar de los avances recientes, siempre se necesitan mejoras con respecto a los sistemas existentes, y, en particular, son muy deseadas las plataformas de administración génica que amplían las capacidades de los vectores de la técnica anterior en cuanto a las eficacias de transfección y expresión y/o en cuanto a las propiedades físicas de los vectores.

Breve descripción de la invención

Los presentes inventores han descubierto ahora que el uso de oro con las SLN es muy ventajoso en cuanto a las

50 eficacias de transfección y expresión y/o en cuanto a las propiedades físicas de las SLN.

Si bien el uso de oro se ha propuesto en el pasado en el contexto de liposomas, generalmente con el objetivo de proporcionar robustez y, por tanto, estabilidad a sus núcleos acuosos, hasta donde saben los inventores nunca se

ha sugerido para las SLN, que, a diferencia de los liposomas, no requieren estabilización del núcleo porque ya poseen núcleos lipídicos sólidos. Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, se ha descubierto sorprendentemente que el oro todavía puede usarse aun así de manera ventajosa en vectores de SLN.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una SLN que comprende:

- 5 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo;
- un tensioactivo catiónico;
- un tensioactivo no iónico;
- oro, en la que el oro está adsorbido sobre la superficie de la SLN o se encuentra en una fase hidrofílica de la SLN que rodea el núcleo lipídico de la SLN; y
- 10 - un ácido nucleico.

Los presentes inventores también han descubierto sorprendentemente que el método mediante el cual se prepara la SLN del primer aspecto de la invención puede tener un impacto en las eficacias de transfección y expresión y/o las propiedades físicas de la SLN mencionadas anteriormente, lo que permite una gran versatilidad para seleccionar como diana tipos de células diferentes y variados.

- 15 Por tanto, el segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una SLN como se define en el primer aspecto de la invención (a continuación en el presente documento, denominado "procedimiento Au"), comprendiendo el procedimiento:

- a) preparar una suspensión de SLN precursora, comprendiendo dicha SLN precursora:
 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo de la SLN precursora;
 - 20 - un tensioactivo catiónico; y
 - un tensioactivo no iónico;
 - b) preparar una disolución que comprende:
 - un ácido nucleico; y
 - oro;
 - 25 c) mezclar la suspensión de SLN precursora obtenida en la etapa (a) con la disolución obtenida en la etapa (b).

De manera similar, el tercer aspecto de la invención se refiere a otro procedimiento para la preparación de una SLN como se define en el primer aspecto de la invención (a continuación en el presente documento, denominado "procedimiento Oro"), comprendiendo el procedimiento:

- 30 a) preparar una suspensión de SLN de oro precursora, comprendiendo dicha SLN de oro precursora:
 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo;
 - un tensioactivo catiónico;
 - un tensioactivo no iónico; y
 - oro;
 - 35 b) preparar una disolución que comprende un ácido nucleico;
 - c) mezclar la suspensión de SLN de oro precursora obtenida en la etapa (a) con la disolución obtenida en la etapa (b).

Asimismo, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la SLN del primer aspecto de la invención.

- 40 En otro aspecto, la invención se refiere a la SLN del primer aspecto de la invención para su uso como medicamento, y más particularmente para su uso en terapia génica.

Descripción de los dibujos

La figura 1 representa una pluralidad de nanopartículas de oro obtenidas según el método de Turkevich descrito en

el ejemplo 1 de la presente solicitud.

La figura 2 ilustra una pluralidad de SLN según la presente invención. En particular, es una imagen de TEM de una pluralidad de nanopartículas SLN_Au-P-HA según el ejemplo 9 de la presente solicitud.

5 La figura 3 muestra imágenes de tinción de inmunofluorescencia de tejido corneal tras el tratamiento tópico con una formulación comparativa (a) SLN-P-HA-ARNm; o con una formulación según la presente invención (b) SLN_Au-P-HA-ARNm, (c) SLN_Au-P-DX-ADN o (d) SLN_Oro-P-DX-ADN. Las áreas rodeadas con círculos identifican la fluorescencia de GFP.

Descripción detallada de la invención

10 En el contexto de la presente invención, el término “nanopartícula lipídica sólida” o “SLN” se refiere a una estructura que comprende un núcleo lipídico lipófilo rodeado por una fase hidrófila que encapsula el núcleo.

En particular, la invención se refiere a una pluralidad de SLN según la invención. Tal pluralidad de SLN también se denomina en el presente documento “sistema” de la invención. Se entiende que las realizaciones descritas en el presente documento para las SLN de la invención son igualmente aplicables a la pluralidad de SLN. El término “pluralidad” se refiere a cualquier número de SLN que se emplea normalmente en la práctica para el almacenamiento o la administración a un sujeto, y puede oscilar entre tan solo 10^2 y cualquier número razonable para el propósito previsto, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz pero no tóxica de SLN.

En una realización, la SLN de la invención tiene un tamaño comprendido entre 1 y 1000 nm, más particularmente entre 100 y 800 nm.

20 De manera similar, el sistema de SLN de la invención presenta preferiblemente tamaños de SLN promedio comprendidos entre 1 y 1000 nm, más particularmente entre 100 y 800 nm. Por “tamaño promedio” se entiende el tamaño promedio de la pluralidad de SLN que comprenden tanto la fase lipófila en el núcleo de la SLN, la fase hidrófila que rodea dicho núcleo, así como cualquier componente de la SLN adsorbido sobre la misma. En algunos casos, todavía es posible encontrar poblaciones aisladas, normalmente agregados de SLN, que oscilan hasta aproximadamente 10 μ m dentro del sistema de la invención; sin embargo, estas se encuentran igualmente dentro del alcance de la invención siempre que el tamaño promedio del sistema esté dentro de los intervalos indicados anteriormente.

30 Los tamaños promedio de las SLN en estos sistemas pueden medirse mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica, tal como mediante microscopía (por ejemplo, microscopía óptica, microscopía electrónica de tinción negativa, microscopía electrónica de transmisión (TEM), crio-TEM, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía confocal y microscopía de sonda de barrido), técnicas de difracción y dispersión (dispersión de luz láser y espectroscopía de correlación de fotones) y técnicas hidrodinámicas (fraccionamiento de flujo de campo, cromatografía de permeación en gel, ultracentrifugación y sedimentación centrífuga). Las técnicas preferidas son la dispersión dinámica de luz (DLS) y más específicamente la espectroscopía de correlación de fotones. Los tamaños medidos por DLS corresponden al diámetro de la esfera que difunde a la misma velocidad que la partícula que está midiéndose.

40 El sistema de SLN de la invención presenta preferiblemente un índice de polidispersidad (PDI) de 0,7 o inferior, más particularmente de entre 0,2 y 0,5. El término “polidispersidad” (o “dispersidad” tal como recomienda la IUPAC) se usa para describir la distribución de poblaciones de tamaño dentro de una muestra dada y, por tanto, para observar el grado de no uniformidad en los tamaños de dicha muestra. El PDI es adimensional, y los valores numéricos oscilan entre 0,0 (para una muestra perfectamente uniforme con respecto al tamaño de partícula) y 1,0 (para una muestra altamente polidispersa con múltiples poblaciones de tamaño de partícula). Los PDI pueden medirse mediante los métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica mencionados anteriormente para la medición de tamaños de SLN.

45 En el contexto de la presente invención, los métodos usados para la determinación de los parámetros de tamaño y PDI son preferiblemente los definidos en las normas ISO 13321:1996 E e ISO 22412:2008 (edición 1 en ambos casos). Estas mediciones pueden llevarse a cabo empleando un equipo Zetasizer de Malvern Instruments Ltd. apropiado (véase, por ejemplo, la medición tal como se describe en el manual de usuario de Zetasizer Nano, MAN0317, edición 5.0, agosto de 2009 para un dispositivo de la serie Nano ZS).

50 Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que la incorporación de oro en las SLN puede reducir el tamaño y la polidispersidad de las mismas. La posibilidad de reducir estos parámetros físicos cruciales, y con ello mejorar su capacidad de ajuste, son de suma importancia en el campo de la invención, tal como revisan Danaei *et al.*, *Pharmaceutics*. Junio de 2018; 10(2): 57. Los inventores han observado, además, que este efecto es particularmente pronunciado cuando la SLN comprende un glicosaminoglicano (GAG), preferiblemente ácido hialurónico, como polisacárido.

55 Además, las SLN de la invención muestran un potencial zeta que puede variar desde -50 mV hasta +80 mV, y más particularmente desde +5 mV hasta +50 mV. Los potenciales zeta se miden lo más normalmente mediante

velocimetría láser Doppler, o mediante electroforesis láser Doppler, una técnica que combina la electroforesis y la velocimetría láser Doppler. Esta técnica mide qué tan rápido se mueve una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico, es decir, su velocidad. En el contexto de la presente invención, el potencial zeta se mide según la norma ISO 13099-2:2012. Estas mediciones pueden llevarse a cabo empleando un equipo Zetasizer de Malvern Instruments Ltd. apropiado, tal como Zetasizer Nano/Pro/Ultra.

En una realización preferida, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente.

En otra realización preferida, la SLN comprende, además, un polisacárido.

En otra realización preferida, la SLN comprende, además, tanto un polisacárido como un péptido cargado positivamente.

Aunque ya lo implica la estructura de la SLN, la SLN de la presente invención no es ni un liposoma ni un sistema basado en liposomas, en particular no es un sistema que comprende un núcleo acuoso.

A continuación se describen en detalle los diferentes componentes de las SLN de la invención.

Componente lipídico

La SLN de la presente invención comprende al menos un sólido lipídico a temperatura ambiente que forma parte del núcleo de la SLN.

En el contexto de la presente invención, "sólido lipídico a temperatura ambiente" se refiere a un lípido que se mantiene como sólido por debajo de 45 °C, y que puede ser saturado o insaturado. Dicha definición incluye triglicéridos (por ejemplo, tristearina), monoglicéridos o diglicéridos (por ejemplo, Imwitor®), ácidos grasos (por ejemplo, ácido esteárico), esteroides (por ejemplo, colesterol) y ceras (por ejemplo, palmitato de cetilo).

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

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

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

En una realización preferida, se usa palmitoestearato de glicerilo (Precirol® ATO5) como derivado de ácido graso.

En una realización preferida, se usa palmitoestearato de glicerilo (Precirol® ATO5) o monoestearato de glicerilo como sólido lipídico a temperatura ambiente. Más preferiblemente, el sólido lipídico a temperatura ambiente es palmitoestearato de glicerilo.

En otra realización particular, las SLN de la invención comprenden, además, otro componente lipídico, específicamente un líquido lipídico a temperatura inferior a 45 °C, que puede ser saturado o insaturado. El líquido lipídico a temperatura ambiente se selecciona de ésteres de ácidos grasos saturados o insaturados, aceites, ácidos grasos y triglicéridos que tienen una cadena con menos de 10 átomos de carbono, y sus mezclas (por ejemplo, Miglyol®, aceite de soja, miristato de isopropilo, aceite de ricino). En una realización preferida, se usa Mygliol 212 como líquido lipídico.

Tensioactivo catiónico

El término "tensioactivo catiónico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que tiene una parte hidrófoba y una parte hidrófila que forma iones cargados positivamente en una disolución, normalmente un grupo de cabeza cargado positivamente unido a una cola hidrófoba. La parte hidrófoba se incorpora en el núcleo lipídico de la SLN, y la parte catiónica hidrófila rodea y encierra dicho núcleo formando así la fase hidrófila de la SLN.

Este componente proporciona una carga positiva a la SLN de la invención que facilita su absorción a través de entornos biológicos catiónicos o su adsorción sobre la misma.

En una realización, en la pluralidad de SLN de la presente invención, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 90 % de las SLN no comprenden ningún tensioactivo catiónico adsorbido sobre la superficie de la SLN ni que forme parte de algún complejo adsorbido sobre la superficie de la SLN. El límite porcentual superior se establece en función de la precisión del procedimiento de preparación de la SLN, y puede ser

de hasta el 90 %, hasta el 95 %, hasta el 99 % o hasta el 99,9 %.

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

- 5 Asimismo, pueden usarse derivados de estas sales de amonio. Por derivados de sales de amonio se entiende aquellas sales que incorporan en una misma estructura al menos dos grupos amino primarios, secundarios, terciarios y/o cuaternarios, tales como, por ejemplo, las sales de guanidina, piperazina e imidazol. Esta definición también comprendería sales de aminoácidos, tales como, por ejemplo, las sales de lisina, arginina, ornitina o triptófano. Asimismo, esta definición abarcaría aquellas sales de amonio en las que la carga positiva, en lugar de estar en el átomo de nitrógeno, está en un átomo de fósforo, tales como, por ejemplo, yoduro de ditetradecil(trimetiletilfosfonio)metilfosfonato, yoduro de ditetradecilo(butildimetilfosfonio)metilfosfonato, yoduro de ditetradecil(dimetilisopropilfosfonio)metilfosfonato, o arsénico (yoduro de ditetradecil(trimetilarsonio)metilfosfonato, yoduro de dioleil(trimetilfosfonio)metilfosfonato).

- 15 En una realización preferida de la presente invención, las sales de amonio son sales de tetraalquilamonio, sales de alquilbencildimetilamonio o sales de amonio heterocíclico, más preferiblemente son bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o 1,2-dioleil-3-dimetilamonio-propano (DODAP).

- 20 En una realización, la SLN de la invención comprende al menos dos tensioactivos catiónicos, tal como dos tensioactivos catiónicos. Más particularmente, los dos tensioactivos catiónicos son sales de amonio tal como se describió anteriormente, y lo más particularmente se seleccionan de DOTAP, DODAP, DOTMA o CTAB.

Tensioactivo no iónico

Las SLN de la invención comprenden adicionalmente un tensioactivo no iónico cuyas principales funciones son controlar el tamaño de partícula y conferir estabilidad a la SLN, impidiendo la rotura de esta última y la formación de agregados de la misma.

- 25 El término “tensioactivo no iónico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que tiene una parte hidrófoba y una parte hidrófila que permite producir una emulsión.

- 30 En una realización particular de la presente invención, el tensioactivo no iónico se selecciona de ésteres de ácidos grasos de sorbitano polietoxilados, tales como polisorbato, copolímeros de polietilenglicol y copolímeros de polipropilenglicol, tales como, por ejemplo, Tween, Span, poloxámero. Preferiblemente, el tensioactivo no iónico es un éster de ácido graso de sorbitano polietoxilado, más preferiblemente es un polisorbato, en particular oleato de polioxietileno-sorbitano, y lo más particularmente Tween/polisorbato 80. En otra realización preferida, el tensioactivo no iónico es un poloxámero.

- 35 En una realización, la SLN de la invención comprende al menos dos tensioactivos no iónicos, tal como dos tensioactivos no iónicos. Más particularmente, los dos tensioactivos no iónicos pueden ser un polisorbato y un poloxámero tal como se describió anteriormente.

Oro

- 40 El oro en la SLN de la presente invención puede estar en forma de una nanopartícula o una nanoestructura seleccionada de nanovarillas, nanoelipsoides, nanoprismas, nanoestrellas, nanojaulas y nanocubiertas. En una realización preferida, el oro está en forma de nanopartícula. Estas formas de oro suelen tener un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm, más preferiblemente entre 2 y 50 nm, tal como entre 2 y 8 nm, o tal como entre 15 y 25 nm.

- 45 La pluralidad de SLN de la invención presenta también una pluralidad de nanopartículas o nanoestructuras de oro con tamaños promedio comprendidos entre 1 y 100 nm, más preferiblemente entre 2 y 50 nm, tal como entre 2 y 8 nm, o tal como entre 15 y 25 nm. Por “tamaño promedio” se entiende el tamaño promedio de la pluralidad de nanopartículas o nanoestructuras de oro. Todavía es posible encontrar nanopartículas o nanoestructuras de oro aisladas de un tamaño mayor que el especificado anteriormente, siempre que el tamaño promedio de la pluralidad esté dentro de los intervalos indicados anteriormente.

La pluralidad de oro presenta normalmente un índice de polidispersidad (PDI) de 0,7 o inferior, más particularmente de entre 0,1 y 0,4. El término “polidispersidad” tiene el significado descrito anteriormente.

- 50 Además, las nanopartículas o nanoestructuras de oro normalmente muestran un potencial zeta que puede variar desde -60 mV hasta -20 mV, y más particularmente varía desde -50 mV hasta -40 mV.

Los tamaños, los PDI y los potenciales zeta de las nanopartículas o nanoestructuras de oro se miden de la misma manera que se describió anteriormente para las SLN de la invención.

Este componente puede formar parte de la estructura de la SLN o puede adsorberse sobre la superficie de la misma. Cuando el oro forma parte de la estructura de la SLN, se encuentra en la fase hidrofílica de la SLN, junto con el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

5 Se ha descubierto sorprendentemente que la incorporación de oro, especialmente nanopartículas de oro, normalmente cargadas negativamente, en una SLN, y en particular en la fase hidrofílica de una SLN o adsorbidas sobre la misma, no es perjudicial para la penetración celular, aunque en teoría se esperaría una mayor repulsión/menor afinidad con respecto a la membrana celular también cargada negativamente. De hecho, los niveles de transfección y expresión de ácidos nucleicos pueden aumentarse significativamente con la incorporación de la nanopartícula o nanoestructura de oro.

10 En una realización, en la pluralidad de SLN de la presente invención, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 90 % de las SLN que comprenden oro comprenden el oro en la fase hidrofílica de la SLN o adsorbido sobre la misma. El límite porcentual superior se establece en función de la precisión del procedimiento de preparación de la SLN, y puede ser de hasta el 90 %, hasta el 95 %, hasta el 99 % o hasta el 99,9 %.

15 En una realización, en la pluralidad de SLN de la presente invención, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 90 % de las SLN que comprenden oro comprenden el oro en la fase hidrofílica de la SLN. El límite porcentual superior se establece en función de la precisión del procedimiento de preparación de la SLN, y puede ser de hasta el 90 %, hasta el 95 %, hasta el 99 % o hasta el 99,9 %.

20 En una realización, en la pluralidad de SLN de la presente invención, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 90 % de las SLN que comprenden oro comprenden el oro adsorbido sobre la fase hidrofílica de la SLN. El límite porcentual superior se establece en función de la precisión del procedimiento de preparación de la SLN, y puede ser de hasta el 90 %, hasta el 95 %, hasta el 99 % o hasta el 99,9 %.

25 En la SLN de la presente invención, el oro no está unido covalentemente al ácido nucleico. En la pluralidad de SLN, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 90 % de las nanopartículas o nanoestructuras de oro no están unidas covalentemente al ácido nucleico.

En el contexto de la presente invención, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 90 % de las SLN que comprenden oro no lo comprenden en el núcleo lipídico de la SLN. El límite porcentual superior se establece en función de la precisión del procedimiento de preparación de la SLN, y puede ser de hasta el 90 %, hasta el 95 %, hasta el 99 % o hasta el 99,9 %.

30 Ácido nucleico

Las SLN de la invención pueden albergar ácidos nucleicos y administrarlos a las células, donde se liberan para ejercer su acción terapéutica.

35 El ácido nucleico puede formar parte de la estructura de la SLN o puede adsorberse sobre la superficie de la misma. Cuando el ácido nucleico forma parte de la estructura de la SLN, se encuentra en la fase hidrofílica de la SLN, junto con el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a cualquier cadena de dos o más nucleótidos unidos covalentemente entre sí, incluyendo, sin limitación, ácido ribonucleico (ARN), por ejemplo, i) ARN implicados en la síntesis de proteínas, tales como ARN mensajero (ARNm), por ejemplo, ARNm que codifica para la nucleasa de dedos de zinc (ZFN), ARNm que codifica para la nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN), o ARNm que codifica para CRISPR/Cas9, ARN de transferencia (ARNt), ARN de transferencia-mensajero (ARNtm), ARN ribosómico (ARNr); ii) ARN implicados en la modificación posterior a la transcripción o la replicación del ADN, tales como ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), ARN de SmY, ARN pequeño específico del cuerpo de Cajal (ARNcap), ARN guía (ARNg), ribonucleasa P (ARNasa P), ribonucleasa MRP (ARNasa MRP), ARN de Y, componente de ARN de la telomerasa (TERC), ARN líder sometido a corte y empalme (ARN SL); iii) ARN reguladores, tales como ARN antisentido (ARNa o ARNas), transcrito antisentido natural cis (cis-NAT), ARN de CRISPR (ARNcr), ARN largo no codificante (ARNlnc), microARN (miARN), ARN de interacción con Piwi (ARNpi), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), ARNip transactivo (ARNipta), ARNip asociado a repeticiones (ARNipar), ARN de 7SK, ARN potenciador (ARNe); ácido desoxirribonucleico (ADN), tal como plásmidos o tal como ADN que codifica para la nucleasa de dedos de zinc (ZFN), ADN que codifica para la nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o ADN que codifica para CRISPR/Cas9, ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), ADN mitocondrial (ADNmt), ADN de región de unión a andamiaje/matriz (ADN de S/MAR), ADN antisentido (ADNas); o híbridos de ADN/ARN. Los ARN preferidos son ARNm, ARNip, miARN y ARNas, lo más preferiblemente ARNm. Los ADN preferidos son ADN plasmídico y ADNas. En una realización preferida, el ácido nucleico es un ARNm o un plásmido de ADN. En una
55 realización particular, el ácido nucleico es un ARNm. En otra realización particular, el ácido nucleico es un plásmido de ADN.

Una clase preferida de ácidos nucleicos son los ácidos nucleicos antisentido, es decir, ácidos nucleicos que pueden

unirse a, e inactivar, el ARNm producido a partir de un gen en un sujeto.

El ácido nucleico puede estar compuesto por nucleótidos que se producen de manera natural, o puede estar compuesto por nucleótidos sintéticos (también conocidos como análogos de nucleótidos). Ejemplos de estos últimos nucleótidos son los 2'-O-metil-nucleótidos, los nucleótidos bloqueados (LNA), los nucleótidos en puente (BNA), los morfolinos, y los nucleótidos peptídicos (PNA).

Los ácidos nucleicos pueden ser lineales (por ejemplo, ARNm), circulares (por ejemplo, plásmidos de ADN) o ramificados. Los ácidos nucleicos lineales preferidos son los oligonucleótidos, es decir, ácidos nucleicos constituidos por de 6 a 200, tal como de 10 a 30, nucleótidos o pares de nucleótidos (si el oligonucleótido es bicatenario).

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios, o parcial o completamente bicatenarios. Cuando son bicatenarios, el ácido nucleico puede adoptar una configuración A, B, Z o P. En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico es monocatenario, y más preferiblemente es ARN monocatenario. En otra realización preferida de la invención, el ácido nucleico es bicatenario, y más preferiblemente es ADN bicatenario.

Polisacárido

En algunas realizaciones, la SLN de la presente invención comprende adicionalmente un polisacárido.

Este componente puede formar parte de la estructura de la SLN o puede adsorberse sobre la superficie de la misma. Cuando el polisacárido forma parte de la estructura de la SLN, se encuentra en la fase hidrófila de la SLN, junto con el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

El polisacárido puede formar un complejo con el ácido nucleico por medio de interacción iónica. Dicho complejo se pone en contacto con las SLN precursoras previamente formadas, de manera que el complejo formado por el polisacárido y el principio activo se adsorbe sobre la superficie de dichas nanopartículas o se incorpora en la fase hidrófila de la SLN.

Según una realización particular, el polisacárido comprende la unión de al menos tres monosacáridos. Según otra realización, el polisacárido no es un lipopolisacárido.

En una realización, el polisacárido se selecciona de quitosano, dextrano, carragenina, ácido colomínico, xantano, ciclodextrinas, glicosaminoglicanos, y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el polisacárido es dextrano o un glicosaminoglicano. Ejemplos de glicosaminoglicanos son heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato queratano, y ácido hialurónico. Preferiblemente, el glicosaminoglicano es ácido hialurónico. En una realización particular, el polisacárido es dextrano. En otra realización particular, el polisacárido es ácido hialurónico.

Péptido cargado positivamente

En algunas realizaciones, la SLN de la presente invención comprende adicionalmente un péptido cargado positivamente, es decir, un péptido que se ioniza en disolución para dar una carga neta positiva. Preferiblemente, el péptido cargado positivamente es uno que se carga positivamente cuando se somete a un pH de 10 o inferior, tal como a un pH seleccionado de desde 2,5 hasta 10, preferiblemente cuando se somete a pH fisiológico (pH 7,4). El péptido cargado positivamente también se denomina en el presente documento "péptido con carga neta positiva".

El péptido cargado positivamente puede formar parte de la estructura de la SLN o puede adsorberse sobre la superficie de la misma. Cuando el péptido cargado positivamente forma parte de la estructura de la SLN, se encuentra en la fase hidrófila de la SLN, junto con el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico.

Alternativamente, el péptido cargado positivamente puede formar un complejo junto con el polisacárido y/o el ácido nucleico por medio de interacción iónica. Dicho complejo se pone en contacto con las SLN precursoras previamente formadas, de manera que el complejo formado por el péptido cargado positivamente y el polisacárido y/o el ácido nucleico se adsorbe sobre la superficie de dichas nanopartículas.

En una realización particular de la presente invención, el péptido cargado positivamente se selecciona de péptidos de señalización nuclear y péptidos de señalización mitocondrial, péptidos de ácido arginilglicilaspártico (RGD) y péptidos de penetración celular (CPP). Dicho péptido se selecciona preferiblemente de protaminas e histonas, y lo más preferiblemente es protamina.

En un aspecto, la invención se refiere a una suspensión que comprende la pluralidad de SLN de la invención tal como se describe en cualquier realización anterior dispersas en un medio de suspensión, tal como en un medio de suspensión acuoso, por ejemplo, agua o solución salina. La suspensión puede comprender desde el 1 hasta el 50 % en peso, preferiblemente desde el 10 % hasta el 20 % en peso, de SLN de la invención con respecto al peso total de la suspensión. La suspensión puede comprender componentes adicionales tales como excipientes farmacéuticamente aceptables tal como se describe adicionalmente a continuación. En una realización, la suspensión consiste en SLN de la invención y medio de suspensión.

En una realización, las SLN de la presente invención están en forma liofilizada. Esta forma es adecuada para el almacenamiento de las SLN y la reconstitución de las mismas, tal como la reconstitución en una suspensión tal como se describió anteriormente, en un momento posterior. Los inventores han descubierto que tal procedimiento no altera sustancialmente las capacidades de transfección de las SLN de la presente invención.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a diferentes procedimientos para la preparación de una SLN o una pluralidad de las mismas tal como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores. Específicamente, en el presente documento se proporcionan dos tipos de procedimientos denominados "procedimiento Au" y "procedimiento Oro". Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que las SLN obtenidas mediante estos métodos (pero que comprenden los mismos componentes) difieren en sus propiedades físicas y actividad biológica. Esto permite
10 ajustar con precisión los vectores de la presente invención a contextos biológicos diferentes, tal como, por ejemplo, para seleccionar como diana células de características variables.

Procedimiento Au

En una realización, el procedimiento de la invención comprende las etapas de:

- a) preparar una suspensión de SLN precursora, comprendiendo dicha SLN precursora:
 - 15 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo;
 - un tensioactivo catiónico; y
 - un tensioactivo no iónico;
- b) preparar una disolución que comprende:
 - un ácido nucleico;
 - 20 - oro; y
- c) mezclar la suspensión de SLN precursora obtenida en la etapa a) con la disolución obtenida en la etapa b).

La etapa a) comprende preparar una suspensión de SLN precursora, tal como mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica. En una realización, la etapa a) comprende:

- (i) preparar una disolución que comprende el sólido lipídico a temperatura ambiente en un disolvente orgánico;
- 25 (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico;
- (iii) añadir la disolución acuosa (ii) a la disolución orgánica (i), y someter la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión; y
- (iv) evaporar el disolvente orgánico.

30 La etapa (i) comprende preparar una disolución que comprende el sólido lipídico a temperatura ambiente en un disolvente orgánico, tal como mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como disolviendo el sólido lipídico a temperatura ambiente en un disolvente orgánico. En una realización, la proporción del componente lipídico es de al menos el 0,1 %, preferiblemente de entre el 0,1 y el 40 %, en peso con respecto al peso total de la disolución orgánica.

35 La elección del disolvente orgánico depende en gran medida tanto del componente lipídico como, cuando sea apropiado, del ácido nucleico que va a incorporarse. Independientemente de lo anterior, se prefieren el uso de disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables y el uso de la menor cantidad posible debido al hecho de que posteriormente habrá que eliminarlos en la etapa final del método que conduce a las SLN precursoras.

40 En una realización particular de la invención, el disolvente orgánico se selecciona de diclorometano, acetona, cloroformo, y más preferiblemente es diclorometano. La proporción del disolvente orgánico puede oscilar entre el 1 y el 60 %, preferiblemente entre el 10 y el 30 %, en peso con respecto al peso total de la emulsión obtenida en la etapa (iii).

Cuando va a emplearse un líquido lipídico a temperatura ambiente, puede añadirse a la disolución orgánica en la etapa (i).

45 La etapa (ii) comprende preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico, tal como mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como disolviendo el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico en un disolvente acuoso.

En la etapa (iii), se añade la fase acuosa a la fase orgánica (lipídica). Se prefiere este orden específico de adición. Se somete la mezcla resultante a una agitación rigurosa hasta obtener una emulsión. Una forma preferida de

agitación es la sonicación. La emulsión obtenida en esta etapa es una emulsión de aceite en agua.

Posteriormente, en la etapa (iv), se evapora el disolvente orgánico por medio de cualquier método conocido por un experto en la técnica. En una realización particular, la etapa de evaporación del disolvente orgánico se lleva a cabo manteniendo la emulsión con agitación mecánica durante al menos cinco minutos, sometiéndola posteriormente a vacío durante al menos cinco minutos. Tras eliminar el disolvente orgánico, solidifica la fase lipídica, obteniéndose así las SLN precursoras en forma de suspensión acuosa.

En una realización particular, la etapa a) comprende, además, una etapa v) de aislar las SLN precursoras a partir de la suspensión de SLN precursora obtenida en la etapa iv), tal como mediante centrifugación. En una realización más particular, la etapa de aislamiento incluye enfriar la suspensión de SLN precursora hasta una temperatura comprendida entre 4 y 8 °C y posteriormente filtrar las SLN precursoras mediante centrifugación.

En una realización, pueden liofilizarse las SLN precursoras, con o sin aislamiento. Las SLN liofilizadas pueden almacenarse, y resuspenderse en cualquier medio de suspensión en un momento posterior para su uso en la etapa c) del procedimiento de la invención.

En otra realización, la etapa a) comprende:

- (i) fundir el sólido lipídico a temperatura ambiente;
- (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico;
- (iii) añadir la disolución acuosa (ii) al lípido fundido (i), y someter la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión; y
- (iv) opcionalmente, someter la emulsión (iii) a un procedimiento de homogeneización con una presión de al menos 30 psi.

En la etapa (i), el sólido lipídico a temperatura ambiente se funde a una temperatura mayor que su punto de fusión. Cuando va a usarse un líquido lipídico a temperatura ambiente, puede añadirse al lípido fundido en esta etapa.

La etapa (ii) comprende preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico, tal como mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como disolviendo el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico en un disolvente acuoso.

En una realización, la etapa (ii) comprende calentar la disolución acuosa hasta una temperatura igual a o mayor que el punto de fusión del sólido lipídico a temperatura ambiente de la etapa (i). Por ejemplo, el sólido lipídico a temperatura ambiente en la etapa (i) y la disolución acuosa en la etapa (ii) se calientan independientemente hasta la misma temperatura.

En la etapa (iii), se añade la fase acuosa a la fase orgánica (lipídica). Se prefiere este orden específico de adición. Preferiblemente, la adición se lleva a cabo mientras la fase acuosa y la fase lipídica están a una temperatura igual a o mayor que el punto de fusión del sólido lipídico a temperatura ambiente de la etapa (i).

Se somete la mezcla resultante a agitación. Una forma preferida de agitación es la sonicación. La agitación se realiza preferiblemente a una temperatura igual a o mayor que el punto de fusión del sólido lipídico a temperatura ambiente de la etapa (i). La emulsión obtenida en esta etapa es una emulsión de aceite en agua.

Puede dejarse enfriar la emulsión obtenida hasta por debajo del punto de fusión del sólido lipídico a temperatura ambiente de la etapa (i). De esta manera, precipita dicho lípido y se obtiene la suspensión de SLN precursora. El enfriamiento puede realizarse de forma natural simplemente eliminando el calentamiento y exponiendo la emulsión a temperatura ambiente, o se acelera preferiblemente sometiendo la emulsión a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente, tal como colocando el recipiente que contiene la emulsión en un baño de hielo.

Opcionalmente, en la etapa (iv), se somete la emulsión resultante de la etapa (iii) a una etapa de homogeneización por medio de cualquier método conocido por un experto en la técnica, con el propósito de obtener una suspensión de SLN precursora.

Por "homogeneización" se entiende cualquier procedimiento que permite reducir, por medios mecánicos, el tamaño de los glóbulos formados en la emulsión resultante de llevar a cabo las etapas (i) a (iii). Los ejemplos de métodos de homogeneización incluyen homogeneización a alta presión, sonicación, mezclado a alta cizalladura o la aplicación de estrés mecánico o fuerzas de impacto. En la etapa (iv), la emulsión (iii) puede someterse a homogeneización más de una vez, con el mismo método de homogeneización o con uno diferente.

La etapa de homogeneización puede omitirse cuando la agitación de la etapa (iii) es suficiente para reducir el tamaño de glóbulo en la emulsión y, por tanto, el tamaño de partícula de SLN precursora en la suspensión hasta el deseado. La técnica y el tiempo de agitación pueden afectar al tamaño de las partículas. Por ejemplo, cuando se emplea sonicación como técnica de agitación, un tiempo de agitación de aproximadamente 30 min producirá

partículas de SLN precursoras de aproximadamente 100-150 nm, mientras que un tiempo menor producirá tamaños más grandes, y podría requerir una etapa de homogeneización a presión posterior para reducir adicionalmente el tamaño de partícula.

5 En una realización particular, la etapa a) comprende, además, una etapa v) de aislar las SLN precursoras a partir de la suspensión de SLN precursora obtenida en la etapa iv), tal como mediante centrifugación. En una realización más particular, la etapa de aislamiento incluye enfriar la suspensión de SLN precursora hasta una temperatura comprendida entre 4 y 8 °C y posteriormente aislar las SLN precursoras, tal como filtrando las SLN precursoras mediante centrifugación.

10 En una realización, pueden liofilizarse las SLN precursoras, con o sin aislamiento. Las SLN liofilizadas pueden almacenarse, y resuspenderse en cualquier medio de suspensión en un momento posterior para su uso en la etapa c) del procedimiento de la invención.

15 En una realización, la cantidad de sólido lipídico a temperatura ambiente comprendida en la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas es de entre el 10 % y el 90 %, preferiblemente de entre el 40 % y el 80 %, particularmente de aproximadamente el 65 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas, respectivamente. Estos valores no incluyen ningún medio de suspensión. En otra realización, cuando está en forma de suspensión, la cantidad de sólido lipídico a temperatura ambiente está comprendida entre el 0,1 % y el 20 %, preferiblemente entre el 0,5 % y el 5 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

20 En otra realización, la cantidad de líquido lipídico a temperatura ambiente comprendida en la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas es de entre el 0,1 y el 30 %, preferiblemente de entre el 1 y el 20 %, particularmente de aproximadamente el 7 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas, respectivamente. Estos valores no incluyen ningún medio de suspensión. En otra realización, cuando está en forma de suspensión, la cantidad de líquido lipídico a temperatura ambiente está comprendida entre el 0,01 y el 5 %, preferiblemente entre el 0,05 y el 2 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

25 En otra realización, la cantidad de tensioactivo catiónico comprendida en la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas es de entre el 2,5 % y el 50 %, preferiblemente de entre el 15 % y el 35 %, particularmente de aproximadamente el 25 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas, respectivamente. Estos valores no incluyen ningún medio de suspensión. En otra realización, cuando está en forma de suspensión, la cantidad de tensioactivo catiónico oscila entre el 0,05 % y el 10 %, preferiblemente entre el 0,1 % y el 2 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

30 En otra realización, la cantidad de tensioactivo no iónico comprendida en la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas es de entre el 0,1 y el 25 %, preferiblemente de entre el 1 y el 15 %, particularmente de aproximadamente el 7 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas, respectivamente. Estos valores no incluyen ningún medio de suspensión. En otra realización, cuando está en forma de suspensión, la cantidad de tensioactivo no iónico está comprendida entre el 0,001 y el 10 %, preferiblemente entre el 0,01 y el 3 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

Se entiende que la suma de la cantidad específica elegida para cada componente de la SLN precursora, la pluralidad o la suspensión de las mismas sumará como máximo el 100 % en peso con respecto al peso total de la SLN precursora, la pluralidad o la suspensión de las mismas, respectivamente.

40 En otra realización, la cantidad de oro añadida durante el método de la invención es de entre 10^5 y 9×10^{17} en número de partículas de oro, preferiblemente de entre 10^7 y 9×10^{16} en número de partículas de oro, por mg de SLN precursora aislada. Alternativamente, cuando las SLN precursoras están en suspensión, la cantidad de oro añadida oscila entre 10^6 y 9×10^{19} en número de partículas de oro, preferiblemente entre 10^8 y 9×10^{17} en número de partículas de oro, por ml de suspensión de SLN precursora.

45 La cantidad de ácido nucleico que va a añadirse dependerá en cada caso de la naturaleza del ácido nucleico que va a incorporarse, de la indicación para la que se use y de la eficiencia de administración. En una realización, la cantidad de ácido nucleico añadida es de entre el 0,001 % y el 95 %, preferiblemente de entre el 0,1 y el 60 %, particularmente de aproximadamente el 7 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas. Alternativamente, cuando las SLN precursoras están en suspensión, la cantidad de ácido nucleico añadida es de hasta el 20 % en peso, preferiblemente de entre el 0,00001 % y el 20 %, preferiblemente de entre el 0,001 y el 10 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

50 En otra variante de la invención, cuando está presente un polisacárido, la cantidad de polisacárido que va a añadirse es de entre el 0,01 y el 95 %, preferiblemente de entre el 0,05 y el 60 %, particularmente es de aproximadamente el 15 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas. Alternativamente, cuando las SLN precursoras están en suspensión, la cantidad de polisacárido añadida está comprendida entre el 0,0001 y el 20 %, preferiblemente entre el 0,001 % y el 10 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

En otra variante de la invención, cuando está presente un péptido cargado positivamente, la cantidad de péptido cargado positivamente que va a añadirse está comprendida entre el 0,1 % y el 95 %, preferiblemente entre el 0,5 % y el 60 %, particularmente es de aproximadamente el 15 %, en peso con respecto al peso total de la SLN precursora aislada o la pluralidad de las mismas. Alternativamente, cuando las SLN precursoras están en suspensión, la cantidad de péptido cargado positivamente añadida está comprendida entre el 0,001 y el 20 %, preferiblemente entre el 0,01 % y el 10 %, en peso con respecto al peso total de la suspensión de SLN precursora.

La cantidad de SLN precursora en la suspensión de SLN precursora oscila entre 0,5 y 100, preferiblemente entre 5 y 30, mg de SLN precursora por ml de medio de suspensión.

Las cantidades anteriores para cada uno de los componentes pueden cumplirse en su totalidad o sólo en algunas de ellas, en cuyo caso se considera que la presente solicitud abarca cualquier combinación de las cantidades individuales indicadas anteriormente para cada componente.

La etapa b) comprende preparar una disolución que comprende el ácido nucleico y el oro, tal como mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como disolviendo el ácido nucleico y el oro en un disolvente. Si la SLN va a comprender un polisacárido y/o un péptido cargado positivamente, estos se añaden a la disolución de la etapa b). En una realización, en primer lugar se prepara una disolución del ácido nucleico y el oro, a la que luego se le añaden, preferiblemente después de agitar, el polisacárido y/o el péptido cargado positivamente. Cuando van a añadirse tanto el polisacárido como el péptido cargado positivamente, se prefiere añadir en primer lugar el péptido cargado positivamente y luego se añade el polisacárido, preferiblemente con agitación entre las dos adiciones. En una realización preferida, la disolución es una disolución acuosa, tal como una disolución en agua.

La etapa c) implica poner en contacto la disolución de la etapa b) con las SLN precursoras obtenidas en la etapa a). Preferiblemente, el contacto se realiza a temperatura ambiente, tal como durante al menos cinco minutos, para producir una suspensión según la presente invención.

En una realización alternativa, el procedimiento Au comprende, además, una etapa d) de aislar las SLN a partir de la mezcla obtenida en la etapa c), tal como mediante centrifugación. En una realización más particular, la etapa de aislamiento incluye enfriar la mezcla hasta una temperatura comprendida entre 4 y 8 °C y posteriormente filtrar las SLN mediante centrifugación.

En una realización, pueden liofilizarse las SLN, con o sin aislamiento. Las SLN liofilizadas pueden almacenarse, y resuspenderse en cualquier medio de suspensión en un momento posterior para producir una suspensión según la invención.

Los excipientes empleados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden añadirse a las SLN en cualquier etapa. Dependiendo de la naturaleza del excipiente específico, se añadirá a la fase lipófila o hidrófila de las SLN precursoras durante su preparación tal como se describió anteriormente, o se añadirá a las SLN precursoras después de su preparación, o se añadirá a las SLN durante o después de su preparación, o se añadirá a la suspensión durante o después de su preparación.

Procedimiento Oro

El segundo método de la invención difiere del procedimiento Au en que el oro se añade a las SLN precursoras antes de que se mezclen con el ácido nucleico. Por tanto, el procedimiento Oro comprende:

a) preparar una suspensión de SLN de oro precursora, comprendiendo dicha SLN de oro precursora:

- un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo;
- un tensioactivo catiónico;
- un tensioactivo no iónico; y
- oro;

b) preparar una disolución que comprende un ácido nucleico; y

c) mezclar la suspensión de SLN de oro precursora obtenida en la etapa a) con la disolución obtenida en la etapa b).

Todas las realizaciones descritas anteriormente para el procedimiento Au se aplican haciendo los cambios necesarios al procedimiento Oro, con las siguientes excepciones.

En lugar de introducir el oro en la etapa b), el oro se introduce durante la etapa a). En una realización, el oro se añade durante la etapa (ii) de preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico. En otra realización, el oro se añade después de la etapa (iv), en particular se añade a la suspensión de SLN precursora obtenida en la etapa (iv), o si se omite la etapa (iv), se añade a la suspensión de SLN

precursora obtenida en la etapa (iii). En cualquier caso, la cantidad de oro que va a añadirse es la misma que la definida anteriormente para el procedimiento Au. La SLN precursora que contiene el oro (SLN de oro precursora) así obtenida puede aislarse, liofilizarse y resuspenderse tal como se describe para el procedimiento Au. De manera similar, la cantidad del resto de componentes es la definida para el procedimiento Au.

- 5 El oro empleado en los procedimientos Au y Oro puede obtenerse mediante una variedad de modos conocidos por el experto en la técnica, tales como los descritos por Kimling *et al.*, J. Phys. Chem. B 2006, 110, 15700-15707; Huang *et al.*, Chem. Eng. Sci. Volumen 189, 2 de noviembre de 2018, páginas 422-430; Li *et al.*, Nanomedicine (Londres). Enero de 2015; 10(2): 299-320; o Song *et al.*, Langmuir 2011, 27, 13854-13860. Alternativamente, el oro puede obtenerse a partir de fuentes comerciales, tal como de Sigma Aldrich (ID 741949 ó 741965).
- 10 En una realización, el oro se obtiene mediante el método de Turkevich. El método comprende añadir una disolución de citrato, tal como citrato de sodio, a una disolución de ácido cloroáurico, a altas temperaturas tales como a al menos 80 °C, y preferiblemente a entre 80 °C y 100 °C, por ejemplo, a 90 °C. Preferiblemente, la disolución de ácido cloroáurico se proporciona como disolución en agua. En una realización, la disolución de ácido cloroáurico se calienta hasta la temperatura indicada inmediatamente antes, y el citrato de sodio se añade una vez que se alcanza la temperatura objetivo, preferiblemente en forma de una disolución en agua, y preferiblemente calentado previamente para evitar caídas de temperatura en la mezcla de reacción. Puede añadirse más agua a la mezcla de reacción para ajustar cualquier pérdida de volumen de reacción. La agitación de la mezcla de reacción puede avanzar inicialmente a las temperaturas indicadas inmediatamente antes y posteriormente a temperaturas más bajas, tales como a temperatura ambiente.
- 20 Por tanto, en una realización, cuando el oro se prepara mediante el método de Turkevich, el oro puede añadirse durante el procedimiento de la invención en forma de una disolución, preferiblemente una disolución acuosa, que comprende citrato. Alternativamente, antes de añadir el oro, puede eliminarse el citrato de dicha disolución. Métodos para eliminar el citrato son cualesquiera de los conocidos por el experto, tales como los descritos en G.S. Perera *et al.*, Journal of Colloid and Interface Science 511 (2018) 335-343.
- 25 Por tanto, en una realización relacionada, la SLN o la pluralidad de SLN o la suspensión de la invención comprende citrato.

En cualquiera de los procedimientos Au u Oro, la razón de oro con respecto a ácido nucleico añadidos es la siguiente.

- 30 En cualquier realización descrita en el presente documento, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro puede oscilar entre $1 \cdot 10^7$ y $9 \cdot 10^{12}$ nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Un factor que influye en la cantidad de nanopartículas de oro que va a añadirse es el tamaño de las nanopartículas de oro, siendo necesario un mayor número de nanopartículas para tamaños más pequeños.

- 35 En una realización, la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $3,36 \cdot 10^8$ y $5,36 \cdot 10^8$, tal como $4,36 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $7,72 \cdot 10^8$ y $9,72 \cdot 10^8$, tal como $8,72 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,64 \cdot 10^9$ y $1,84 \cdot 10^9$, tal como $1,74 \cdot 10^9$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 15 y 25 nm, tal como de 20 nm.
- 40

- 45 En una realización, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente, preferiblemente protamina, y la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $3,36 \cdot 10^8$ y $5,36 \cdot 10^8$, tal como $4,36 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $7,72 \cdot 10^8$ y $9,72 \cdot 10^8$, tal como $8,72 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,64 \cdot 10^9$ y $1,84 \cdot 10^9$, tal como $1,74 \cdot 10^9$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 15 y 25 nm, tal como de 20 nm.
- 50

- 55 En una realización, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente, preferiblemente protamina, así como un polisacárido, preferiblemente dextrano, y la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $3,36 \cdot 10^8$ y $5,36 \cdot 10^8$, tal como $4,36 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $7,72 \cdot 10^8$ y $9,72 \cdot 10^8$, tal como $8,72 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,64 \cdot 10^9$ y $1,84 \cdot 10^9$, tal como $1,74 \cdot 10^9$,

nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, las SLN comprenden al menos dos tensioactivos catiónicos, preferiblemente DOTAP y DODAP. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 15 y 25 nm, tal como de 20 nm.

- 5 En una realización, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente, preferiblemente protamina, así como un polisacárido, preferiblemente ácido hialurónico, y la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $3,36 \cdot 10^8$ y $5,36 \cdot 10^8$, tal como $4,36 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $7,72 \cdot 10^8$ y $9,72 \cdot 10^8$, tal como $8,72 \cdot 10^8$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,64 \cdot 10^9$ y $1,84 \cdot 10^9$, tal como $1,74 \cdot 10^9$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 15 y 25 nm, tal como de 20 nm.
- 10
- 15 En una realización, la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,4 \cdot 10^{10}$ y $0,1 \cdot 10^{10}$, tal como $0,73 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $2,67 \cdot 10^{10}$ y $4,67 \cdot 10^{10}$, tal como $3,67 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $6,33 \cdot 10^{10}$ y $8,33 \cdot 10^{10}$, tal como $7,33 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 2 y 8 nm, tal como de 5 nm.
- 20
- 25 En una realización, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente, preferiblemente protamina, y la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,73 \cdot 10^{10}$ y $0,1 \cdot 10^{10}$, tal como $0,73 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $2,67 \cdot 10^{10}$ y $4,67 \cdot 10^{10}$, tal como $3,67 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $6,33 \cdot 10^{10}$ y $8,33 \cdot 10^{10}$, tal como $7,33 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 2 y 8 nm, tal como de 5 nm.
- 30
- 35 En una realización, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente, preferiblemente protamina, así como un polisacárido, preferiblemente dextrano, y la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,73 \cdot 10^{10}$ y $0,1 \cdot 10^{10}$, tal como $0,73 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $2,67 \cdot 10^{10}$ y $4,67 \cdot 10^{10}$, tal como $3,67 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $6,33 \cdot 10^{10}$ y $8,33 \cdot 10^{10}$, tal como $7,33 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 2 y 8 nm, tal como de 5 nm.
- 40
- 45 En una realización, la SLN comprende, además, un péptido cargado positivamente, preferiblemente protamina, así como un polisacárido, preferiblemente ácido hialurónico, y la SLN se prepara según el procedimiento Au. Preferiblemente, en esta SLN, la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $1,73 \cdot 10^{10}$ y $0,1 \cdot 10^{10}$, tal como $0,73 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $2,67 \cdot 10^{10}$ y $4,67 \cdot 10^{10}$, tal como $3,67 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. Otra realización se refiere a esta misma SLN, en la que la razón de ácido nucleico con respecto a nanopartículas de oro oscila entre $6,33 \cdot 10^{10}$ y $8,33 \cdot 10^{10}$, tal como $7,33 \cdot 10^{10}$, nanopartículas de oro por μg de ácido nucleico. En una realización diferente, también se aplican estas razones, pero la SLN se prepara según el procedimiento Oro. En cualquiera de las realizaciones de este párrafo, el oro puede tener un tamaño de entre 2 y 8 nm, tal como de 5 nm.
- 50
- 55 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la razón peso/peso de sólido lipídico a temperatura ambiente añadido durante la etapa a) con respecto a ácido nucleico añadido durante la etapa b) es de desde 1:1 hasta 10:1, preferiblemente desde 3:1 hasta 7:1, más preferiblemente es de 5:1.

La suspensión de la invención puede emplearse sin eliminar el oro, el ácido nucleico, el polisacárido o el péptido cargado positivamente que no esté ni en la fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de las SLN de la invención. Estos componentes se denominan en el presente documento componentes "libres" y pueden ser subproductos de

60

algunos métodos de preparación del sistema o la suspensión de la invención.

Por tanto, en una realización relacionada, la suspensión de la invención comprende, además, oro que se encuentra en el medio de suspensión y no se encuentra ni en la fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de las SLN de la invención. Por tanto, en una realización, como máximo el 80 %, preferiblemente como máximo el 50 %, incluso más preferiblemente como máximo el 20 %, en peso del oro en la suspensión de la invención con respecto al peso total del oro en dicha suspensión es oro libre.

De manera similar, en una realización relacionada, la suspensión de la invención comprende, además, ácido nucleico que se encuentra en el medio de suspensión y no se encuentra ni en la fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de las SLN de la invención. Por tanto, en una realización, como máximo el 80 %, preferiblemente como máximo el 50 %, incluso más preferiblemente como máximo el 20 %, en peso del ácido nucleico en la suspensión de la invención con respecto al peso total del ácido nucleico en dicha suspensión es ácido nucleico libre. Los pesos del ácido nucleico libre en el caso de ácido nucleico monocatenario y bicatenario pueden diferir debido a su arquitectura molecular diferente y, por tanto, también debido a su interacción diferente con las SLN de la invención. Por tanto, en una realización, la cantidad de ácido nucleico libre se selecciona de la lista anterior independientemente para cada uno de estos ácidos nucleicos.

De manera similar, en una realización relacionada, la suspensión de la invención comprende, además, polisacárido que se encuentra en el medio de suspensión y no se encuentra ni en la fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de las SLN de la invención. Por tanto, en una realización, como máximo el 80 %, preferiblemente como máximo el 50 %, incluso más preferiblemente como máximo el 20 %, en peso del polisacárido en la suspensión de la invención con respecto al peso total del polisacárido en dicha suspensión es polisacárido libre.

De manera similar, en una realización relacionada, la suspensión de la invención comprende, además, péptido cargado positivamente que se encuentra en el medio de suspensión y no se encuentra ni en la fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de las SLN de la invención. Por tanto, en una realización, como máximo el 80 %, preferiblemente como máximo el 50 %, incluso más preferiblemente como máximo el 20 %, en peso del péptido cargado positivamente en la suspensión de la invención con respecto al peso total del péptido cargado positivamente en dicha suspensión es péptido cargado positivamente libre.

De manera similar, las SLN que no tienen oro ni en su fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de la SLN también pueden estar comprendidas en la suspensión de la invención. Por tanto, en una realización, como máximo el 80 %, preferiblemente como máximo el 50 %, incluso más preferiblemente como máximo el 20 %, en peso de la totalidad de las SLN en la suspensión son SLN que no tienen oro ni en su fase hidrófila ni adsorbido sobre la superficie de la SLN.

En otro aspecto importante no reivindicado, la divulgación se refiere a una SLN, o a una pluralidad de las mismas, o a una suspensión de las mismas, obtenida mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

Por ejemplo, la suspensión de la divulgación es una que se obtiene preparando una suspensión de SLN precursora tal como se describe en cualquier parte del presente documento, tal como en las cantidades descritas en el presente documento, y añadiendo oro, ácido nucleico y opcionalmente el resto de los componentes de la SLN de la invención, en las cantidades descritas en el presente documento.

En otro aspecto no reivindicado, la divulgación se refiere a una SLN de oro precursora tal como se describió anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende la SLN o la pluralidad de SLN de la invención, o la suspensión de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente" se refiere a un vehículo, diluyente o adyuvante que se administra con las SLN con el fin de lograr o facilitar la acción farmacológica deseada. Se describen excipientes farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin, 1995, e incluyen solubilizadores; agentes antifloculantes; estabilizadores, especialmente los de naturaleza estérica, iónica o tensioactiva; moduladores de la viscosidad; agentes de control del pH tales como, por ejemplo, agentes tampón que impiden que el pH de la composición disminuya hasta valores inferiores a 5; agentes antioxidantes que inhiben la oxidación del componente lipídico; así como conservantes que impiden cambios estructurales importantes en la formulación.

Dependiendo de su función e hidrofilia, estos excipientes pueden estar presentes en cualquiera de las fases que constituyen las SLN o adsorbidos sobre las mismas, o en el medio de suspensión donde se dispersan las SLN.

La composición farmacéutica según la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para la aplicación a seres humanos y/o animales, tal como aplicación tópica o sistémica, particularmente para administración dérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intravesical, intraósea, intracavernosa, pulmonar, bucal, sublingual, ocular, intranasal, percutánea, rectal, vaginal, oral, epidural, intratecal, intraventricular, intracerebral, intracerebroventricular, intracisternal,

- 5 intraespinal, periespinal, intracraneal, administración mediante agujas o catéteres con o sin dispositivos de bomba, u otras vías de aplicación. Una vía preferida de administración es la vía ocular, por ejemplo, mediante inyección subretiniana, inyección intravítrea o inyección subconjuntival, o mediante administración tópica al ojo. Una vía preferida de administración ocular es la administración tópica al ojo, en particular a la córnea. Otra vía particular de administración es la vía intravenosa. Otra vía particular de administración es la vía intramuscular. Otra vía particular de administración es la vía oral.
- Otro aspecto de la invención se refiere a la SLN o a la pluralidad de SLN o a la suspensión o a la composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento, preferiblemente para su uso en terapia génica.
- 10 De manera similar, la invención se refiere al uso de la SLN o de la pluralidad de SLN o de la suspensión o de la composición farmacéutica de la invención, en la fabricación de un medicamento para terapia génica.
- De manera similar, la divulgación se refiere a un método no reivindicado de terapia génica, comprendiendo el método administrar a un paciente que necesita tal terapia una cantidad terapéuticamente eficaz de la SLN o de la pluralidad de SLN o de la suspensión o de la composición farmacéutica de la invención.
- 15 En el contexto de la presente invención, el término "terapia génica" se refiere al tratamiento de un sujeto que implica la inserción de un ácido nucleico en las células de dicho sujeto con el propósito de prevenir o tratar una enfermedad. La introducción del ácido nucleico en las células del huésped normalmente logra la expresión de dicho ácido nucleico para producir un producto de expresión que efectúa la prevención o el tratamiento de la enfermedad, tal como una proteína funcional que compensa la ausencia, la subexpresión o la deficiencia funcional de la proteína en el sujeto. Alternativamente, la terapia génica puede implicar el silenciamiento o la edición de genes cuya expresión o sobreexpresión provoca la enfermedad.
- 20 El término "tratamiento" y términos derivados en el contexto de este documento se refieren a la mejora o eliminación de la enfermedad o de uno o más síntomas asociados con la enfermedad. El término "prevención" y términos derivados se refieren a eliminar o reducir el riesgo de que aparezca o se desarrolle la enfermedad.
- 25 Cuando se usan para prevenir o tratar enfermedades, las SLN de la presente invención se emplean en cantidades terapéuticamente eficaces. El médico determinará la dosificación de SLN que es la más adecuada según el caso, teniendo en cuenta la forma específica de administración, el perfil específico del paciente en tratamiento, y el tipo específico de enfermedad a tratar.
- Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las SLN de la presente invención son capaces de transfectar y permitir la expresión de ácidos nucleicos en una variedad de células de naturaleza diferente.
- 30 Por tanto, en una realización, la enfermedad que va a tratarse se selecciona de una enfermedad ocular y una enfermedad cardíaca.
- 35 En una realización particular, la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad ocular. Ejemplos de tales enfermedades son glaucoma; degeneración macular; retinopatía, incluyendo retinopatía diabética y retinopatía isquémica; infecciones o inflamaciones corneales, tales como herpes simple; amaurosis congénita de Leber; opacidad de la superficie corneal; retinitis pigmentaria; albinismo; coroideremia; retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X; enfermedad de Stargardt; retinoblastoma; distrofia corneal granular; distrofia corneal de Fuchs; distrofia corneal gelatinosa en forma de gotas; rechazo de trasplante de córnea; y opacidad de la superficie corneal asociada con la mucopolisacaridosis. Una enfermedad preferida es la retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X.
- 40 En una realización particular, la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad cardíaca. Ejemplos de tales enfermedades son hipertrofia cardíaca, tal como hipertrofia ventricular; trastornos autofágicos o asociados con la hipertrofia cardíaca, tales como estenosis de la vena pulmonar, defecto del tabique auricular o ventricular, miocardiopatía hipertrófica no obstructiva u obstructiva, o enfermedad de Fabry; y/o disfunción cardíaca tal como disfunción contráctil, descompensación cardíaca o insuficiencia cardíaca, remodelación ventricular después de un infarto de miocardio, o miocarditis.
- 45 En una realización particular, la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son una clase de aproximadamente 50 enfermedades metabólicas humanas diferentes provocadas por una deficiencia de proteínas lisosómicas específicas que da como resultado la acumulación de diversas sustancias dentro de los compartimentos endosómicos/lisosómicos. Ejemplos de tales enfermedades son enfermedad de Pompe, enfermedad de Fabry, y enfermedad de Gaucher, MPS I, MPS II, MPS VII, Tay Sachs, Sandhoff, α -manosidosis, o enfermedad de Wohlman. Una enfermedad preferida es la enfermedad de Fabry.
- 50 La presente invención también se refiere al uso cosmético, más específicamente al uso de terapia genética cosmética, de la SLN o de la pluralidad de SLN o de la suspensión de la invención. Ejemplos de tales usos son el tratamiento de la piel grasa, el acné, la sequedad de la piel, el tono de piel no deseado o el envejecimiento o sus efectos tales como las arrugas o la falta de firmeza de la piel. Tal como se explicó anteriormente para los usos terapéuticos, la terapia génica cosmética implica genes relacionados con las afecciones cosméticas anteriores.
- 55

A continuación se describen algunos ejemplos ilustrativos que muestran claramente las características y ventajas de la invención; no obstante, no deben interpretarse como limitativos del objeto de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

5 Las SLN de la presente invención se caracterizaron mediante los siguientes métodos:

1. Imágenes de microscopio

Se observaron las partículas de oro y las SLN mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se adhirieron 10 µl de la muestra sobre rejillas recubiertas con carbono sometidas a descarga luminiscente durante 60 s. Después de retirar el líquido restante, mediante absorción sobre papel de filtro, se llevó a cabo la tinción con acetato de uranilo al 2 % durante 60 s. Las muestras se visualizaron usando un TEM Philips EM208S y las imágenes digitales se adquirieron en una cámara digital púrpura Olympus SIS.

2. Tamaño de partícula y carga superficial

El tamaño de partícula y el PDI de las partículas de oro y las SLN se midieron por medio de dispersión dinámica de luz (DLS), más específicamente por medio de espectroscopía de correlación de fotones (PCS). La carga superficial se midió por medio de velocimetría láser Doppler. Ambos parámetros se midieron con el equipo Zetasizer Nano ZS.

3. Estudios de transfección y expresión

Se llevaron a cabo estudios de transfección y expresión de ácidos nucleicos en las líneas celulares ARPE-19 (epitelio pigmentario retiniano humano), HEK-293 (riñón embrionario humano), HL-1 (miocardiocitos de rata adulta) y/o IMFE-1 (línea celular endotelial de Fabry inmortalizada-1). Las células ARPE-19 se mantuvieron en cultivo en medio Eagle modificado por Dulbecco:mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12) con suero bovino fetal al 10 %, antibiótico de penicilina y estreptomycin al 1 %. Las células HEK293 se mantuvieron en cultivo en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con suero bovino fetal al 10 %, antibiótico de penicilina y estreptomycin al 1 %. Las células HL-1 se mantuvieron en cultivo en medio Claycomb con suero bovino fetal al 10 %, antibiótico de penicilina y estreptomycin al 1 %, norepinefrina 0,1 mM y L-glutamina 2 mM. Las células IMFE-1 se mantuvieron en medio basal EBM™-2 y complementos EGM™-2 SingleQuots™. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de aire con el 5 % de CO₂, cambiando el medio cada 2 ó 3 días.

Para las células ARPE-19, los estudios de transfección se realizaron en placas de 12 pocillos con densidades de 60.000 células por pocillo. Para las células HEK293, los estudios de transfección se realizaron en placas de 24 pocillos con densidades de 100.000 células por pocillo. Para las células HL-1, los estudios de transfección se realizaron en placas de 24 pocillos con densidades de 150.000 células por pocillo. Para las células IMFE, los estudios de transfección se realizaron en placas de 24 pocillos con 30.000 células por pocillo. Los cultivos se dejaron incubarse hasta alcanzar una confluencia del 80-90 %. Al alcanzar el 80-90 % de confluencia, se retiró parte del medio, dejando el volumen necesario para cubrir todo el pocillo, y luego se añadió el sistema de nanopartículas que iba a estudiarse. Se incubaron durante 4 horas y luego se añadió más volumen de medio nuevo. La cantidad de vectores añadidos a cada pocillo fue equivalente a 2,5 µg de ADN o ARNm.

Ejemplo 1 Preparación de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNP) o bien se obtuvieron de Sigma Aldrich (ref. 741965) o bien se prepararon mediante el método de Turkevich. Se calentaron 10 ml de disolución de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) 1 mM hasta 90 °C y luego se añadió 1 ml de disolución de citrato de sodio (Na₃C₆H₅C₇) 38,8 mM con agitación continua. Después de 2 minutos de la adición del citrato, se añadieron 3 ml de agua destilada para mantener el volumen de reacción. Después de 5 minutos de la adición del citrato (color rojo intenso), se añadieron 1,5 ml de agua destilada, se detuvo el calentamiento y se dejó agitando la mezcla de reacción. Después de 8 minutos de la adición del citrato, se cesó la agitación y se dejó enfriar la mezcla de reacción. En la figura 1 se muestran imágenes de TEM de las nanopartículas de oro.

Ejemplo 2 (comparativo). Preparación de SLN sin oro, péptido cargado positivamente ni polisacárido (SLN)

Se prepara una disolución de Precirol al 5 % en diclorometano (2 ml). Además, se prepara una disolución acuosa (10 ml) de DOTAP al 0,4 % y Tween 80 al 0,1 %. Se añade la fase acuosa a la fase oleosa, sometiendo la mezcla a una agitación rigurosa hasta obtener una emulsión. Luego se evapora el disolvente orgánico, manteniendo la emulsión con agitación mecánica durante al menos 5 minutos, sometiéndola posteriormente a vacío durante al menos 5 minutos. Precipita de ese modo el lípido, obteniéndose una suspensión de SLN. Después de enfriar hasta una temperatura de entre 4 y 8 °C, se filtran las SLN mediante centrifugación y se resuspenden en agua purificada.

Se prepara una disolución de ácido nucleico (o bien pcDNA3-EGFP o bien ARNm de EGFP CleanCap®) 0,2 µg/µl en agua destilada. Luego se pone en contacto la suspensión de SLN con la disolución que contiene el ácido nucleico (o bien ARNm o bien ADN) en una razón de 5:1 (expresada como la razón peso/peso entre DOTAP y ácido nucleico)

y se mantiene con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se somete a prueba la mezcla resultante como tal.

Ejemplo 3 (comparativo). Preparación de SLN sin oro ni polisacárido pero con péptido cargado positivamente (SLN-P).

- 5 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadió protamina a la disolución que contiene el ácido nucleico y se agitó la mezcla durante 5 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN.

Ejemplo 4 (comparativo). Preparación de SLN sin oro pero con péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) (SLN-P-DX)

- 10 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron protamina y dextrano a la disolución que contiene el ácido nucleico. Se agitó la mezcla de protamina y ácido nucleico durante 5 minutos antes del contacto con el dextrano. Se agitó la mezcla de protamina, ácido nucleico y dextrano durante 15 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN.

Ejemplo 5 (comparativo). Preparación de SLN sin oro pero con péptido cargado positivamente y polisacárido (ácido hialurónico) (SLN-P-HA)

- 15 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron protamina y ácido hialurónico a la disolución que contiene el ácido nucleico. Se agitó la mezcla de protamina y ácido nucleico durante 5 minutos antes del contacto con el ácido hialurónico. Se agitó la mezcla de protamina, ácido nucleico y ácido hialurónico durante 15 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN.

- 20 Ejemplo 6. Preparación de SLN con oro y sin péptido cargado positivamente ni polisacárido por medio del procedimiento Au (SLN_Au)

Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1 a la disolución que contiene el ácido nucleico y se agitó la mezcla durante 15 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN.

- 25 Ejemplo 7. Preparación de SLN con oro y sin polisacárido pero con péptido cargado positivamente por medio del procedimiento Au (SLN_Au-P)

Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1, así como protamina, a la disolución que contiene el ácido nucleico. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro y ácido nucleico durante 15 minutos antes del contacto con protamina. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro, ácido nucleico y protamina durante 5 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN.

- 30 Ejemplo 8. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) por medio del procedimiento Au (SLN_Au-P-DX)

- 35 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1, así como protamina y dextrano, a la disolución que contiene el ácido nucleico. La mezcla de nanopartículas de oro y ácido nucleico se agitó durante 15 minutos antes del contacto con protamina. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro, ácido nucleico y protamina durante 5 minutos antes del contacto con el dextrano. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro, ácido nucleico, protamina y dextrano durante 15 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN.

Ejemplo 9. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (ácido hialurónico) por medio del procedimiento Au (SLN_Au-P-HA)

- 40 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1, así como protamina y ácido hialurónico, a la disolución que contiene el ácido nucleico. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro y ácido nucleico durante 15 minutos antes del contacto con protamina. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro, ácido nucleico y protamina durante 5 minutos antes del contacto con ácido hialurónico. Se agitó la mezcla de nanopartículas de oro, ácido nucleico, protamina y ácido hialurónico durante 15 minutos antes del contacto con la suspensión de SLN. En la figura 2 se muestra una imagen de TEM del sistema de SLN obtenido.

Ejemplo 10. Preparación de SLN con oro y sin péptido cargado positivamente ni polisacárido por medio del procedimiento Oro (SLN_Oro)

Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1 a la fase acuosa durante la preparación de la SLN de oro precursora.

- 50 Ejemplo 11. Preparación de SLN con oro y sin polisacárido pero con péptido cargado positivamente por medio del procedimiento Oro (SLN_Oro-P)

Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1 a la fase acuosa durante la preparación de la SLN de oro precursora, y se añadió protamina a la disolución que contiene el ácido nucleico; se agitó la mezcla de protamina y ácido nucleico durante 5 minutos antes del contacto con la SLN de oro precursora.

5 Ejemplo 12. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) por medio del procedimiento Oro (SLN Oro-P-DX)

10 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1 a la fase acuosa durante la preparación de la SLN de oro precursora, y se añadieron protamina y dextrano a la disolución que contiene el ácido nucleico. Se agitó la mezcla de protamina y ácido nucleico durante 5 minutos antes del contacto con dextrano. Se agitó la mezcla de protamina, ácido nucleico y dextrano durante 15 minutos antes del contacto con la SLN de oro precursora.

Ejemplo 13. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (ácido hialurónico) por medio del procedimiento Oro (SLN Oro-P-HA)

15 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2, sólo que se añadieron las nanopartículas de oro del ejemplo 1 a la fase acuosa durante la preparación de la SLN de oro precursora, y se añadieron protamina y dextrano a la disolución que contiene el ácido nucleico. Se agitó la mezcla de protamina y ácido nucleico durante 5 minutos antes del contacto con ácido hialurónico. Se agitó la mezcla de protamina, ácido nucleico y ácido hialurónico durante 15 minutos antes del contacto con la SLN de oro precursora.

Ejemplo 14. Propiedades físicas de las SLN

20 Se midieron el tamaño, la dispersidad y la carga superficial de las SLN que comprenden ARNm o ADN plasmídico como ácido nucleico. A continuación se muestran ejemplos. SLN por sí solo indica una nanopartícula lipídica sólida que no comprende oro. Las extensiones _Au u _Oro indican una SLN según la presente invención, preparada según el procedimiento Au o el Procedimiento Oro, respectivamente.

	Tamaño / nm	PDI	Potencial zeta / mV
Oro	27,1 ± 2,1	0,37 ± 0,03	-45,1 ± 1,4
SLN	268,60 ± 9,97	0,41 ± 0,02	36,07 ± 0,80
SLN_Oro	267,23 ± 6,60	0,42 ± 0,03	36,75 ± 0,92
SLN-P	167,00 ± 3,94	0,22 ± 0,02	38,02 ± 4,29
SLN_Au-P	164,53 ± 0,06	0,23 ± 0,01	37,35 ± 1,13
SLN-P-HA	602,93 ± 37,48	0,89 ± 0,1	21,28 ± 0,88
SLN_Au-P-HA	208,97 ± 3,62	0,34 ± 0,01	29,35 ± 0,39
SLN-P-DX*	164,50 ± 4,04	0,31 ± 0,03	48,17 ± 5,47
SLN_Au-P-DX*	154,33 ± 4,71	0,30 ± 0,04	47,77 ± 1,90
SLN_Oro-P-DX*	151,33 ± 1,70	0,28 ± 0,03	43,75 ± 1,74

*La prueba se llevó a cabo con nanopartículas de oro de 5 nm comerciales y ADN como ácido nucleico.

25 Tal como puede observarse, a pesar del hecho de añadir un componente adicional al sistema de SLN, la incorporación del oro no dio como resultado ningún aumento de tamaño/PDI o incluso produjo SLN con tamaño/PDI inferior. Este efecto fue particularmente notable en las SLN que comprendían el polisacárido GAG.

Ejemplo 15. Poder de transfección de las SLN

30 Se midió el porcentaje de células transfectadas logrado en diferentes líneas celulares con diferentes sistemas de SLN. A continuación se muestran ejemplos representativos.

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN	ARPE-19	ARNm	24,01 ± 0,82

SLN_Au	ARPE-19	ARNm	54,65 ± 1,08
SLN-P	ARPE-19	ARNm	66,25 ± 1,26
SLN_Au-P	ARPE-19	ARNm	84,85 ± 1,40
SLN-P-HA	ARPE-19	ARNm	79,04 ± 5,06
SLN_Au-P-HA	ARPE-19	ARNm	83,34 ± 0,01
SLN-P-DX*	ARPE-19	ADN	7,75 ± 0,76
SLN_Au-P-DX*	ARPE-19	ADN	9,48 ± 0,74
SLN	HEK-293	ADN	21,69 ± 0,11
SLN_Oro	HEK-293	ADN	26,21 ± 0,59
SLN-P-DX	HEK-293	ADN	1,53 ± 1,84
SLN_Oro-P-DX	HEK-293	ADN	5,71 ± 0,59
SLN-P-DX	HEK-293	ARNm	4,52 ± 0,04
SLN_Oro-P-DX	HEK-293	ARNm	48,51 ± 0,78
SLN	HL-1	ARNm	6,69 ± 1,49
SLN_Au	HL-1	ARNm	15,35 ± 0,85
SLN-P-DX*	IMFE-1	ADN	29,29 ± 1,72
SLN_Oro-P-DX	IMFE-1	ADN	37,05 ± 2,26

*La prueba se llevó a cabo con nanopartículas de oro de 5 nm comerciales.

Tal como puede observarse, la incorporación de oro a las SLN produjo niveles de transfección aumentados. Se observó una transfección aumentada tanto para el ARNm como para el ADN, así como en líneas celulares muy distintas.

5 Ejemplo 16. Poder de expresión de las SLN

Se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por las células tras la transfección en las mismas del ácido nucleico que codifica para GFP. A continuación se muestran ejemplos representativos.

	Línea celular	Ácido nucleico	Intensidad de fluorescencia / UFR
SLN	ARPE-19	ADN	15823,35 ± 2133
SLN_Oro	ARPE-19	ADN	274320,35 ± 1800
SLN	ARPE-19	ADN	15823,35 ± 2133
SLN_Au	ARPE-19	ADN	260473,05 ± 14960
SLN-P-DX*	ARPE-19	ADN	195092,05 ± 32068
SLN_Au-P-DX*	ARPE-19	ADN	283810,20 ± 66701
SLN_Oro-P-DX*	ARPE-19	ADN	230255, ± 6449
SLN-P	HEK-293	ARNm	351519,20 ± 12858
SLN_Au-P	HEK-293	ARNm	419097,10 ± 20998
SLN-P-HA	ARPE-19	ARNm	202270,10 ± 111
SLN_Oro-P-HA	ARPE-19	ARNm	453336,33 ± 19

SLN-P-HA	ARPE-19	ARNm	202270,10 ± 111
SLN_Au-P-HA	ARPE-19	ARNm	267546,23 ± 21
SLN-P-DX	HEK-293	ADN	249593,90 ± 10445
SLN_Oro-P-DX	HEK-293	ADN	482162,45 ± 18800
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	125533,45 ± 893
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	495108,55 ± 85
SLN	HL-1	ARNm	9543,77 ± 1136
SLN_Au	HL-1	ARNm	63564,67 ± 2990
SLN-P-DX	IMFE-1	ARNm	109838,00 ± 7745
SLN_Au-P-DX	IMFE-1	ARNm	195672,63 ± 23612
SLN-P-DX*	IMFE-1	ADN	470962,17 ± 13412
SLN_Au-P-DX*	IMFE-1	ADN	555295,83 ± 31727
SLN_Oro-P-DX	IMFE-1	ADN	535023,03 ± 34748

*La prueba se llevó a cabo con nanopartículas de oro de 5 nm comerciales.

Tal como puede observarse, la incorporación de oro a las SLN produjo niveles de expresión de ácido nucleico aumentados. Se observó una expresión aumentada tanto para el ARNm como para el ADN, así como en líneas celulares muy distintas.

5 Ejemplo 17. SLN preparadas mediante emulsificación por fusión en caliente y potencia de transfección/expresión

Se calentaron 100 mg de Precirol hasta 75-85 °C. Además, se prepara una disolución acuosa (10 ml de H₂O) de 40 mg de DOTAP y 10 mg de Tween 80 y se calienta hasta 75-85 °C. Se añade la fase acuosa a la fase oleosa, se somete la mezcla a sonicación durante 30 minutos a una temperatura de 75-85 °C, y se deja enfriar la mezcla resultante en hielo para precipitar el lípido y obtener una suspensión de SLN, a la que se le añaden las nanopartículas de oro del ejemplo 1.

Se prepara una disolución de ARNm de EGFP CleanCap® en agua destilada. En primer lugar se añade protamina y luego dextrano a la disolución, que luego se agita durante 15 min. Luego se pone en contacto la suspensión de SLN de oro precursora con la disolución que contiene el ácido nucleico, protamina y dextrano en una razón de 5:1 (expresada como la razón peso/peso entre DOTAP y ácido nucleico) y se mantiene la mezcla con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se somete a prueba la formulación resultante como tal en la línea celular ARPE-19.

Se midió el porcentaje de células transfectadas y se comparó con el de una formulación de SLN que no comprendía oro:

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	71,46 ± 1,52
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	75,27 ± 1,08

También se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por las células tras la transfección en las mismas del ácido nucleico que codifica para GFP:

	Línea celular	Ácido nucleico	Intensidad de fluorescencia / UFR
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	263443 ± 10700
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	365073 ± 23981

Ejemplo 18. SLN preparadas mediante emulsificación por fusión en caliente y potencia de transfección/expresión

Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 17, sólo que se emplearon 30 mg de CTAB como tensioactivo catiónico y se emplearon 20 mg de poloxámero 338 como tensioactivo no iónico.

- 5 Adicionalmente, se prepara un segundo conjunto de SLN con los mismos componentes, pero añadiendo el oro al ácido nucleico, a la protamina y al dextrano antes del contacto con las SLN precursoras (procedimiento Au).

Se midió el porcentaje de células transfectadas y se comparó con el de una formulación de SLN que no comprendía oro:

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	5,91 ± 1,25
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	11,39 ± 3,86
SLN_Au-P-DX	ARPE-19	ARNm	13,12 ± 2,46

También se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por las células tras la transfección en las mismas del ácido nucleico que codifica para GFP:

	Línea celular	Ácido nucleico	Intensidad de fluorescencia / UFR
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	3013,80 ± 228,78
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	3540,03 ± 428,27
SLN_Au-P-DX	ARPE-19	ARNm	3320,27 ± 527,12

- 10 Ejemplo 19. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) por medio del procedimiento Au (SLN_Au-P-DX) y poder de transfección/expresión

Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 8, sólo que se reemplazó la mitad de la cantidad de DOTAP por DODAP.

- 15 Se midió el porcentaje de células transfectadas y se comparó con el de una formulación de SLN que no comprendía oro:

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN-P-DX	HEK-293	ARNm	42,13 ± 0,76
SLN_Au-P-DX	HEK-293	ARNm	56,40 ± 2,31

También se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por las células tras la transfección en las mismas del ácido nucleico que codifica para GFP:

	Línea celular	Ácido nucleico	Intensidad de fluorescencia / UFR
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	311369 ± 12034
SLN_Au-P-DX	ARPE-19	ARNm	395461 ± 117

Ejemplo 20. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) por medio del procedimiento Oro (SLN_Oro-P-DX) y poder de transfección/expresión

- 20 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 12, sólo que se reemplazó la mitad de la cantidad de Tween 80 por poloxámero 338.

Se midió el porcentaje de células transfectadas y se comparó con el de una formulación de SLN que no comprendía oro:

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	82,60 ± 2,04
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	88,03 ± 0,59

También se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por las células tras la transfección en las mismas del ácido nucleico que codifica para GFP:

	Línea celular	Ácido nucleico	Intensidad de fluorescencia / UFR
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	660812 ± 42769
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	758814 ± 12685

Ejemplo 21. Preparación de SLN con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) por medio del procedimiento Au (SLN Au-P-DX) o procedimiento Oro (SLN Oro-P-DX) y poder de transfección/expresión

- 5 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 8 ó 12, sólo que se empleó monoestearato de glicerilo en lugar de Precirol.

Se midió el porcentaje de células transfectadas y se comparó con el de una formulación de SLN que no comprendía oro:

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	66,16 ± 1,62
<u>SLN Au-P-DX</u>	ARPE-19	ARNm	84,35 ± 1,84
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	74,96 ± 0,90

- 10 También se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por las células tras la transfección en las mismas del ácido nucleico que codifica para GFP:

	Línea celular	Ácido nucleico	Intensidad de fluorescencia / UFR
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	142407 ± 8993
<u>SLN Au-P-DX</u>	ARPE-19	ARNm	239483 ± 7875
SLN_Oro-P-DX	ARPE-19	ARNm	157815 ± 3448

Ejemplo 22. Preparación de SLN liofilizadas con oro, péptido cargado positivamente y polisacárido (dextrano) por medio del procedimiento Oro (SLN Oro-P-DX) y poder de transfección

- 15 Las SLN se prepararon tal como se describe en el ejemplo 12, sólo que las SLN de oro precursoras se aislaron, se liofilizaron, se almacenaron en estado liofilizado durante un mes, y se reconstituyeron en una suspensión, antes del contacto con la disolución que comprende protamina, dextrano y ácido nucleico.

Se evaluó el porcentaje de células transfectadas logrado con las SLN según el ejemplo 12, con una formulación equivalente que no comprendía oro, y con las SLN según el ejemplo 12 con liofilización intermedia tal como se describió anteriormente:

	Línea celular	Ácido nucleico	% de células transfectadas
SLN-P-DX	ARPE-19	ARNm	59,39 ± 1,55
<u>SLN Oro-P-DX</u>	ARPE-19	ARNm	74,03 ± 2,41

SLN_Oro-P-DX (con lio.)	ARPE-19	ARNm	71,64 ± 1,46
-------------------------	---------	------	--------------

Ejemplo 23. Ensayo *in vivo*

Para evaluar la capacidad de las SLN de la invención para transfectar la córnea, se administraron por vía tópica gotas oftálmicas que contenían SLN-P-HA o SLN_Au-P-HA con ARNm de EGFP CleanCap™ (TriLink BioTechnologies) como ácido nucleico en la superficie ocular de ratones C57BL/6. Este ARNm codifica para el indicador GFP, que es una proteína intracelular. El estudio *in vivo* fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco UPV/EHU y los procedimientos cumplieron con la legislación española y de la Unión Europea (UE).

Se administraron un total de 4,5 µg de ARNm al día durante 3 días. Se administraron tres instilaciones de 2,5 µl de las formulaciones empleando una micropipeta a un ojo de cada animal (el otro ojo se mantuvo como control) a intervalos de 3 minutos, dos veces con 12 h de separación.

Cuarenta y ocho horas después de la última dosis, se sacrificaron los ratones y se extrajeron, se fijaron, y se cortaron los globos oculares. Se realizó tinción de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFP de manera cualitativa. Los cortes de tejido se examinaron bajo un microscopio confocal Zeiss LSM800 (ZEISS Microscopy, Oberkochen, Alemania). Se usó adquisición secuencial para evitar la superposición de los espectros de emisión fluorescente.

Las imágenes obtenidas muestran que tanto SLN-P-HA (figura 3a) como SLN_Au-P-HA (figura 3b) pudieron transfectar el tejido corneal; mientras que los controles confirmaron la ausencia de fluorescencia. Sin embargo, en la córnea de ratones tratados con la formulación de SLN_Au-P-HA, la intensidad de fluorescencia en las capas epitelial y endotelial y, por tanto, la cantidad de proteína producida, fueron mayores. También se confirmó un patrón similar de expresión para otras SLN según la invención, y también con ADN como ácido nucleico, tal como en las formulaciones de SLN_Au-P-DX (figura 3c) o SLN_Oro-P-DX (figura 3d).

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula lipídica sólida (SLN) que comprende:
 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo de la nanopartícula lipídica sólida;
 - un tensioactivo catiónico;
 - 5 - un tensioactivo no iónico;
 - oro, en la que el oro está adsorbido sobre la superficie de la SLN o se encuentra en una fase hidrofílica de la SLN que rodea el núcleo lipídico de la SLN; y
 - un ácido nucleico.
2. SLN según la reivindicación 1, que comprende, además, un péptido con una carga neta positiva.
- 10 3. SLN según la reivindicación 2, en la que el péptido es protamina.
4. SLN según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, además, un polisacárido.
5. SLN según la reivindicación 4, en la que el polisacárido es dextrano o un glicosaminoglicano, preferiblemente el glicosaminoglicano es ácido hialurónico.
- 15 6. Suspensión que comprende una pluralidad de nanopartículas lipídicas sólidas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 dispersas en un medio de suspensión.
7. Procedimiento para la preparación de una SLN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
 - a) preparar una suspensión de SLN precursora, comprendiendo dicha SLN precursora:
 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo de la SLN precursora;
 - 20 - un tensioactivo catiónico; y
 - un tensioactivo no iónico;
 - b) preparar una disolución que comprende:
 - un ácido nucleico;
 - oro; y
 - 25 - si se requiere en la SLN que va a obtenerse, un péptido con carga neta positiva y/o un polisacárido;
 - c) mezclar la suspensión de SLN precursora obtenida en la etapa (a) con la disolución obtenida en la etapa (b).
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa a) comprende:
 - 30 (i) preparar una disolución que comprende el sólido lipídico a temperatura ambiente en un disolvente orgánico;
 - (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico;
 - (iii) añadir la disolución acuosa (ii) a la disolución orgánica (i), y someter la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión; y
 - (iv) evaporar el disolvente orgánico.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa a) comprende:
 - (i) fundir el sólido lipídico a temperatura ambiente;
 - (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico y el tensioactivo no iónico;
 - (iii) añadir la disolución acuosa (ii) al lípido fundido (i), y someter la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión; y
 - 40 (iv) opcionalmente, someter la emulsión (iii) a un procedimiento de homogeneización con una presión de al menos 30 psi.

10. Procedimiento para la preparación de una SLN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
 - a) preparar una suspensión de SLN de oro precursora, comprendiendo dicha SLN de oro precursora:
 - un sólido lipídico a temperatura ambiente en el núcleo de la SLN de oro precursora;
 - 5 - un tensioactivo catiónico;
 - un tensioactivo no iónico; y
 - oro;
 - b) preparar una disolución que comprende:
 - un ácido nucleico; y
 - 10 - si se requiere en la SLN que va a obtenerse, un péptido con una carga neta positiva y/o un polisacárido;
 - c) mezclar la suspensión de SLN de oro precursora obtenida en la etapa (a) con la disolución obtenida en la etapa (b).
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa a) comprende:
 - 15 (i) preparar una disolución que comprende el sólido lipídico a temperatura ambiente en un disolvente orgánico;
 - (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico, el tensioactivo no iónico y el oro;
 - 20 (iii) añadir la disolución acuosa (ii) a la disolución orgánica (i), y someter la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión; y
 - (iv) evaporar el disolvente orgánico.
12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa a) comprende:
 - 25 (i) fundir el sólido lipídico a temperatura ambiente;
 - (ii) preparar una disolución acuosa que comprende el tensioactivo catiónico, el tensioactivo no iónico y el oro;
 - (iii) añadir la disolución acuosa (ii) al lípido fundido (i), y someter la mezcla resultante a agitación hasta obtener una emulsión; y
 - (iv) opcionalmente, someter la emulsión (iii) a un procedimiento de homogeneización con una presión de al menos 30 psi.
- 30 13. Composición farmacéutica que comprende una pluralidad de SLN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una suspensión como se define en la reivindicación 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. SLN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o suspensión como se define en la reivindicación 6, o composición farmacéutica como se define la reivindicación 13, para uso en terapia génica.

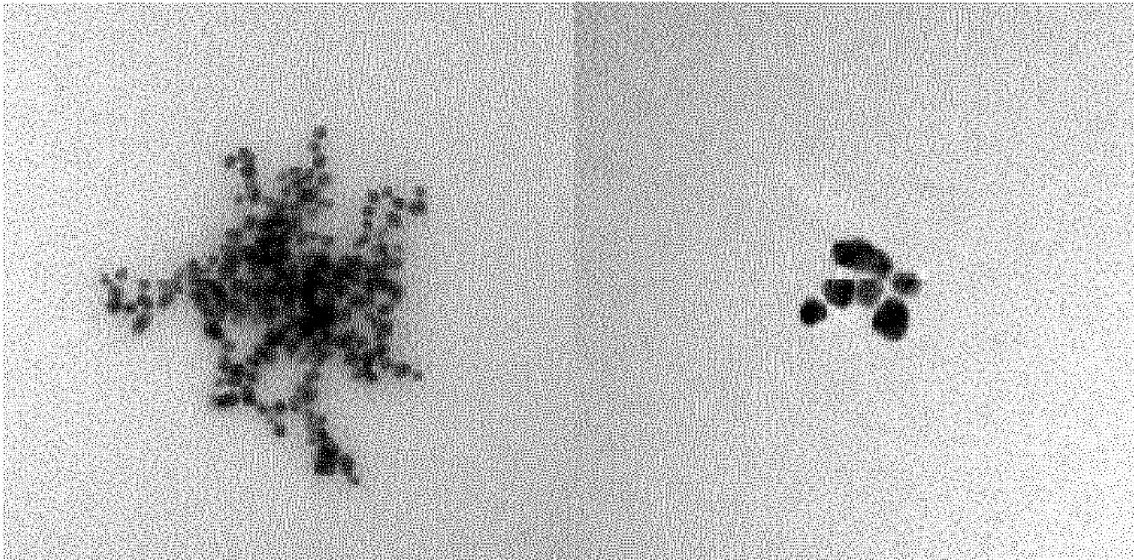


Figura 1

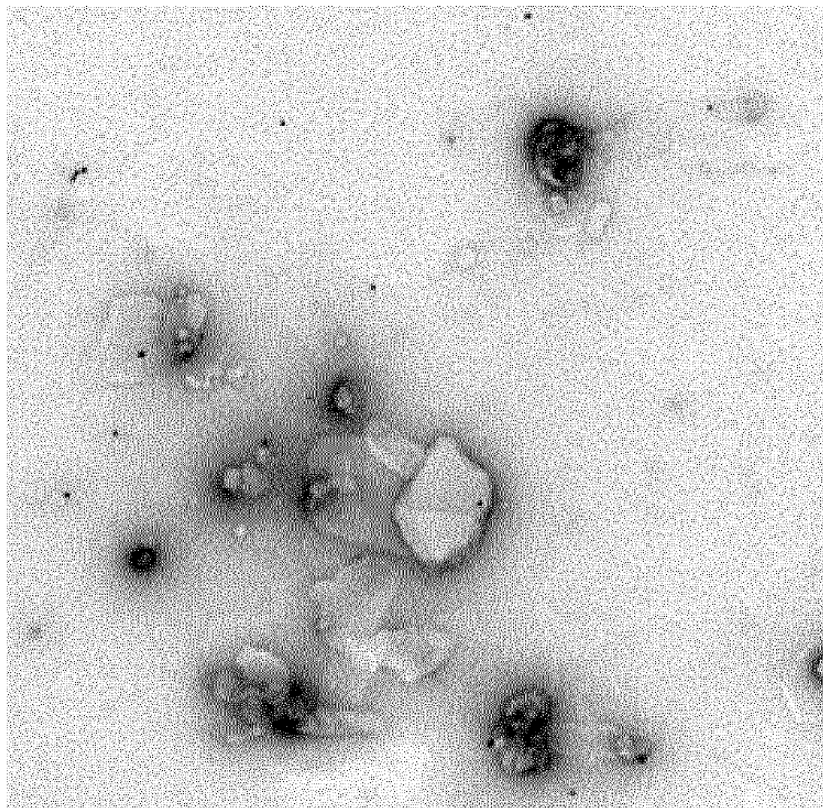
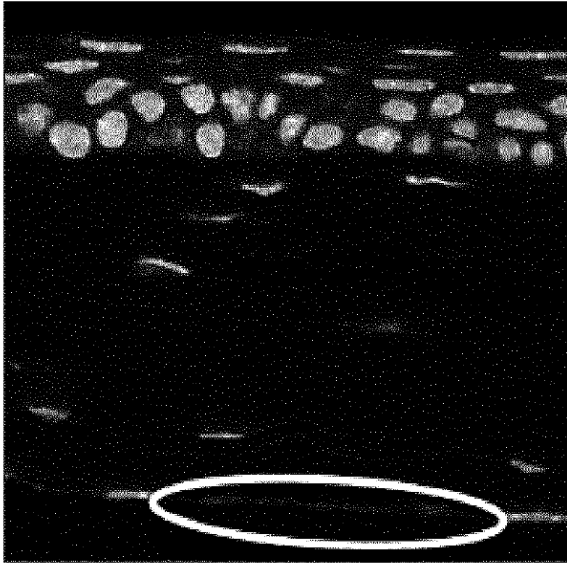
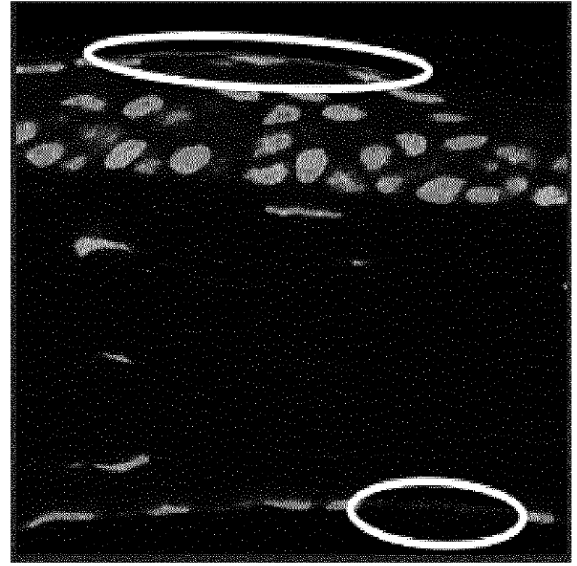


Figura 2

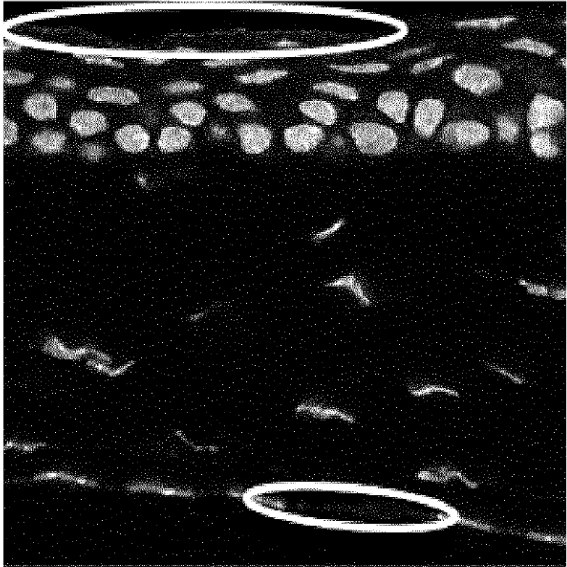
a)



b)



c)



d)

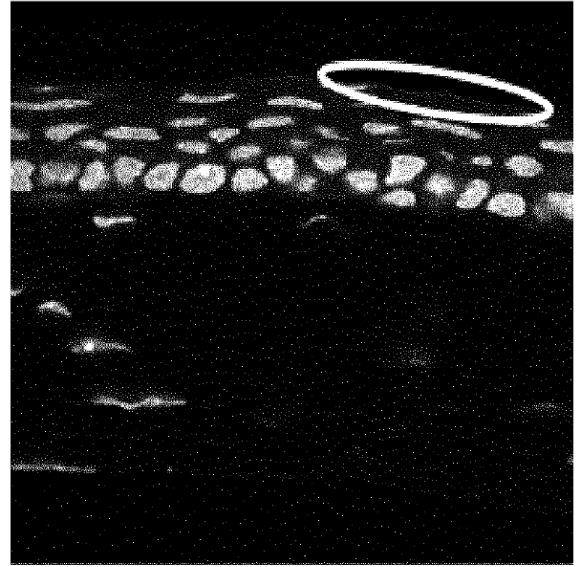


Figura 3