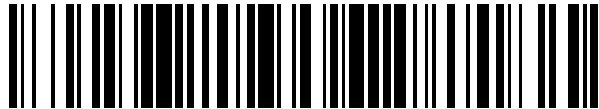


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 565**

21 Número de solicitud: 201800272

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 47/44 (2007.01)
A61K 48/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.12.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.02.2019

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (85.0%)
Sección de Patentes y Contratos (OTRI), Facultad
de Medicina (Edif. Entrepabellones 7 y 8)
C/ Dr. Severo Ochoa, 7 Ciudad Universitaria
28040 Madrid ES;
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE (10.0%) y
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED M.P. (5.0%)

72 Inventor/es:

GARCIA BUENO, Borja;
SAYD GABÁN, Aline;
MONROY MUÑOZ, Francisco;
HERNANDEZ MOLEIRO, Lara y
LEZA CERRO, Juan Carlos

54 Título: **Procedimiento para la elaboración de nanopartículas lipídicas, y nanopartículas lipídicas con los macrófagos cerebrales como células diana**

57 Resumen:

Procedimiento para la elaboración de nanopartículas lipídicas, y nanopartículas lipídicas con los macrófagos cerebrales como células diana.

La invención se refiere a un procedimiento para elaborar nanopartículas lipídicas especialmente dirigidas contra los macrófagos cerebrales perivasculares y meníngeos, que incluye la adición de un derivado de manosa en su capa lipídica como componente funcional que favorece la interacción con la membrana plasmática de las células diana. La funcionalización de las nanopartículas lipídicas se realiza en una etapa intermedia del procedimiento y mediante una reacción directa en la que no se necesita un agente acoplante, evitando la utilización de agentes tóxicos. La invención también se refiere a las nanopartículas lipídicas multilamelares que se obtienen mediante este procedimiento cuyo núcleo, especialmente denso, incluye un ácido nucleico con interés terapéutico y a sus aplicaciones frente a patologías neurológicas/ neurodegenerativas y/o psiquiátricas.

ES 2 698 565 A1

DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS, Y
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CON LOS MACRÓFAGOS CEREBRALES COMO
CÉLULAS DIANA**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en los sectores de la farmacología y la biotecnología. Más concretamente, en la nanofarmacología y la nanobiotecnología con el desarrollo de nanopartículas lipídicas que contienen material genético cuya utilidad se centra en el tratamiento de patologías del sistema nervioso central.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La barrera hematoencefálica (BHE) es fundamental para aislar y proteger al cerebro de la entrada de sustancias potencialmente indeseables o dañinas a través del sistema de circulación de la sangre. Además de su efecto protector, la BHE también supone un impedimento para la entrada de sustancias terapéuticas en el cerebro, bien porque no la pueden atravesar en cantidad suficiente como para ejercer efectivamente su función, bien porque son rápidamente degradadas, o porque los mecanismos activos de la propia barrera los bombean hacia el exterior.

15

20

Por otro lado, son muchas las enfermedades que pueden afectar al cerebro y que preocupan a la sociedad, y son muchos los estudios que se están realizando para desarrollar las terapias adecuadas. Sin embargo, más importante que encontrar principios activos efectivos es desarrollar métodos para que los fármacos administrados lleguen de forma eficiente hasta el cerebro traspasando la BHE. En Chen, Y. *et al.* (2004). *Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. Curr Drug Deliv* 1:361-376 se recopilan distintos métodos para administrar terapias capaces de atravesar la BHE. Existen en la actualidad métodos invasivos basados en cirugía o en la disrupción de la BHE mediante ósmosis, citocinas o productos vasoactivos. Los métodos no invasivos cubren diferentes aproximaciones mediante transporte basado en interacciones moleculares (enlaces de hidrógeno, compuestos lipofílicos), transcitosis mediada por portadores y receptores e inhibición del sistema de flujo (sistemas de liberación de productos químicos, liposomas, nanopartículas). A consecuencia del desarrollo de estos métodos se han producido grandes avances en el uso de liposomas para la

25

30

35

administración de fármacos. En Arias, J.L. (2013). *Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 - present)*. *Expert Opin Ther Pat* 23:1399-414 encontramos una revisión de las patentes publicadas entre 2007 y 2012 sobre el uso de liposomas como vehículos sistémicos de fármacos, y entre ellas se recogen algunas relacionadas con su uso en

5 cerebro.

Uno de los usos más extendidos de los liposomas es la depleción de los macrófagos cerebrales residentes. Los macrófagos cerebrales residentes forman parte de la BHE y son esenciales en la regulación de la entrada de moléculas al parénquima cerebral, además de orquestar una respuesta pro/antiinflamatoria dependiendo del estímulo

10 inflamatorio. Según su localización, se subdividen en macrófagos perivasculares y meníngicos. De este modo, van Rooijen y Sanders (Van Rooijen N, Sanders A (1994). *Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications*. *J Immunol Methods* 174 (1-2):83-93) desarrollaron una

15 técnica de depleción selectiva de macrófagos perivasculares y meníngicos tras la administración intracerebroventricular de la molécula proapoptótica clodronato (diclorometileno-bisfosfonato) en una suspensión concentrada y heterogénea de liposomas con una distribución amplia de tamaños y formas. El método de elaboración de liposomas descrito por estos autores considera la mezcla de fosfatidilcolina y

20 colesterol en cloroformo, retirando el cloroformo mediante evaporación en vacío para obtener una fina película de fosfolípidos que, posteriormente, se dispersa en una solución acuosa y se mantiene bajo nitrógeno durante 1,5-2 horas. El procedimiento de formación de liposomas se completa con sonicación, lavado con PBS, sedimentación y resuspensión final en PBS.

25 Posteriormente, dichos liposomas se han modificado para favorecer su unión específicamente a los macrófagos de la BHE. Du, D. *et al.*, en su artículo *The role of glucose transporters in the distribution of p-aminophenyl-alpha-D-mannopyranoside modified liposomes within mice brain* de 2014 (*J. Control Release* 182:99-110), describen la funcionalización de liposomas con un derivado de manosa, p-aminofenil- α -D-manopiranosido (MAN), para que estos atraviesen la BHE y se dirijan específicamente a ciertas zonas del cerebro (córtex, cerebelo, tronco encefálico e hipocampo). La incorporación de MAN a la superficie del liposoma se realiza una vez formado el liposoma, según un procedimiento que comprende el uso de glutaraldehído como

30 agente acoplante y la posterior diálisis para eliminar tanto el glutaraldehído como el

35

componente MAN no unidos al liposoma. Ese estudio se enfoca en el diseño de vehículos capaces de cruzar la BHE a través de los transportadores de glucosa (GLUT) localizados en las células endoteliales. El estudio considera la unión inespecífica del derivado manosilado a la superficie del liposoma, aunque no garantiza un alto
5 rendimiento de funcionalización ni realiza una optimización de la composición lipídica.

Atendiendo a las moléculas terapéuticas utilizadas en preparados liposomales específicos para atravesar la BHE, se han incluido distintos ácidos nucleicos en liposomas, especialmente oligonucleótidos antisentido con genes diana específicos. El
10 documento *Neurons Are Protected from Excitotoxic Death by p53 Antisense Oligonucleotides Delivered in Anionic Liposomes* (Lakkaraju, A. et al. (2001) *J Biol Chem* 276:32000-32007) hace referencia a un estudio comparativo de la eficacia de distintos liposomas aniónicos y catiónicos como vehículos de oligonucleótidos antisentido dirigidos específicamente a inhibir la expresión de p53 en neuronas. Entre los liposomas
15 descritos en la literatura se encuentran aquellos constituidos por la interacción del oligonucleótido con DOPC/DOPG, DOPC/DOPS, DOPC/DOPA o DC-Colesterol/DOPE (siendo DOPC, dioleoil-glicerofosfolina; DOPG, dioleoil-glicerofosfoglicerol; DOPS, dioleoil-glicerofosfoserina; DC-Colesterol, dimetilaminoetano-carbamil-colesterol; y DOPE, dioleoil-fosfoetanolamina). En estos estudios, el DC-Colesterol se selecciona
20 como componente lipídico catiónico modelo, ya que es bien tolerado por las neuronas por su baja toxicidad; sin embargo, en estos estudios también se comprueba que las neuronas sobreviven al desafío solo cuando la proporción de lípido catiónico da lugar a un complejo con carga neta superficial negativa. En caso de que la carga sea neutra o positiva, se observa una gran pérdida de neuronas.

25 La patente ES2638309T3 describe conjugados formados por ácidos nucleicos específicos para una diana de interés y un componente lipídico que permite la distribución de los ácidos nucleicos a células específicas en el sistema nervioso central. Estos conjugados comprenden liposomas con fosfolípidos neutros tales como POPC (palmitoil-oleoil-glicerofosfolina), DSPE (distearoil-glicerofosfoetanolamina) o
30 colesterol, junto con pequeñas cantidades de lípidos catiónicos.

En el trabajo *Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes* (Kawakami, S. et al. (2000) *Gene Therapy* 7:292-299),
35 se hace referencia a complejos ADN-liposoma en los que el liposoma se funcionaliza

con un derivado de colesterol manosilado (coleston-5-iloxi-N-(4-((1-imino-2-β-D-tiomanosil-etil)amino)butil)formamida). Este estudio demuestra que estos liposomas funcionalizados permiten obtener una alta transfección en macrófagos peritoneales de ratón. La eficacia en la transfección se basa en el hecho de que los macrófagos expresan grandes cantidades de receptores de manosa en su superficie, por tanto, los receptores de manosa reconocen y absorben los complejos de ADN y liposomas manosilados.

El documento *Multifunctional Nanoparticles Facilitate Molecular Targeting and miRNA Delivery to Inhibit Atherosclerosis in ApoE(-/-) Mice* de Kheirulomoon, A., et al. ((2015) *ACS Nano* 9:8885-8897) describe unos liposomas del tipo "core-shell" que poseen un núcleo ("core") constituido por un oligonucleótido (anti-miRNA) estabilizado electrostáticamente con DOTAP (dioleoiloxi-trimetilamonio propano). Además, presentan una cubierta ("shell") lipídica neutra constituida por HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada), colesterol y DSPE-PEG2k (distearoil-glicerofosfoetanolamina-N[metoxi(polietilenglicol)-2000]). En este caso, la incorporación de un oligopéptido al componente lipídico pegilado hace que los liposomas obtenidos se dirijan a las células endoteliales diana.

En la búsqueda de una estrategia para la regulación de los macrófagos residentes en el sistema nervioso central y poder solucionar el obstáculo terapéutico que supone la BHE, la utilización de nanoliposomas (también denominadas nanopartículas lipídicas), como vehículos de ácidos nucleicos con efectos potencialmente terapéuticos, es una de las herramientas que actualmente ofrecen mayor promesa. Sin embargo, aún no se ha desarrollado una metodología sencilla y eficiente que permita obtener este tipo de nanovehículos liposomales específicamente dirigidos a los macrófagos perivasculares y meníngeos para modificarlos selectivamente.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Procedimiento para la elaboración de nanopartículas lipídicas, y nanopartículas lipídicas con los macrófagos cerebrales como células diana.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener nanopartículas lipídicas de tipo "core-shell", o núcleo-corona, de estructura multilamelar conteniendo el material genético hibridado con un lípido catiónico biocompatible a alta

compactación en las láminas acuosas existentes entre las lamelas de las nanopartículas lipídicas. El procedimiento de síntesis de estas estructuras híbridas multilamelares incluye la complejación del ácido nucleico en fase acuosa con un lípido catiónico biocompatible en fase orgánica. Dicha reacción de complejación permite la formación

5 de estructuras encapsulantes similares a micelas inversas suspendidas en fase homogénea de marcado carácter orgánico (monofase de Bligh & Dyer, compuesta por cloroformo, metanol y agua). Dichas estructuras son coloides de asociación constituidos por el lípido catiónico biocompatible, con su fracción hidrofóbica expuesta al medio exterior disolvente (hacia la superficie de la micela) y su extremo polar dispuesto hacia

10 el interior de una cavidad hidrofílica (mayoritariamente acuosa en el corazón de la micela). Bajo condiciones de complejación con el ácido nucleico (de carga negativa), este queda residente en el interior de la estructura micelar inversa, interactuando con la cabeza polar del lípido catiónico biocompatible, todos los contraiones y el agua intersticial contenida en el interior de una nanocavidad altamente hidrofílica en el

15 corazón de la micela inversa. El material genético es un ácido nucleico. En general, puede ser de cualquier tipo (ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico, monocatenario, bicatenario, lineal, circular o combinaciones de ellos) con la limitación de que su tamaño y flexibilidad sean compatibles con su inserción en una cavidad de dimensiones nanométricas. Por tanto, mediante esta estrategia puede complejarse

20 cualquier tipo de oligonucleótido, enrollado o lineal (microARN, ARNsi, ARNm) e incluso ADN plasmídico. Asimismo, la secuencia del ácido nucleico puede incluir análogos de nucleótidos o nucleótidos modificados, con la única limitación de contener hidrofiliidad suficiente para mostrar una preferencia por la cavidad acuosa del interior de los complejos. La diferente carga del ácido nucleico se estabiliza variando la cantidad de

25 lípido catiónico de la formulación. Ejemplos no limitativos de lípido catiónico biocompatible son: 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), 1,2-dioleiloxi-3-dimetilaminopropano (DODMA), dioleiloxi-trimetilamonio propano (DOTAP), bromuro de amonio 1,2-dimiristiloxi-propil-3-dimetil-hidroxi etil amonio (DMRIE), cloruro de 1-[2-(oleiloxi)etilo]-2-oleil-3-(2-hidroxi)etilimidazolinio (DOTIM),

30 dioctadecil-amido-glicilo-espermina (DOGS), bromuro de 1,2-diolililoxipropil-3-dimetil-hidroxi)etilamonio (DORIE), N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-amino-propil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (MVL5), N4-colesteril-espermina HCl Sal (GL67), bis-guanidium-tren-colesterol (BGTC), bis-guanidinium-espermidine-colesterol (BGSC), 3 β -[N-(N',N'-dimetilamino)etano]-carbamoil]colesterol

35 clorhidrato (DC-Chol o DC-colesterol), cloruro de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina

y derivados de etilfosfocolina (DOEPC), 2,3-dioleiloxi-N-(2-(esperminecarboxamido) etil)-N,N-dimetil-1-propanaminium trifluoroacetato (DOSPA). Alternativas clásicas de lípido catiónico utilizadas en estudios modelo son: bromuro de diactadecil-dimetilamonio (DODAB), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano (DSTAP). Preferentemente, dada su disponibilidad comercial, estabilidad química y coste reducido, se seleccionan derivados catiónicos de colesterol como BGTC, BGSC y, más preferentemente, DC-colesterol, un lípido natural funcionalizado con carga positiva.

10 En un primer paso del procedimiento se facilita la interacción del ácido nucleico disuelto en agua con el lípido catiónico biocompatible disuelto en cloroformo, en presencia de metanol estabilizando la monofase orgánica (pueden considerarse otras formulaciones similares a las formadoras de monofase en el diagrama de fases de Bligh & Dyer). Preferentemente, se utiliza una formulación con el mínimo de cloroformo: 50% metanol, 15 30% cloroformo y 20% de agua (porcentajes en masa).

A continuación, se procede a la desestabilización de la monofase de Bligh & Dyer mediante la disminución efectiva del porcentaje de agente compatibilizante (metanol) a través de la adición de cloroformo y agua (preferentemente, hasta alcanzar una 20 composición final: 30% metanol, 40% cloroformo y 30% de agua). Esto causa la separación de fases acuosa y orgánica, con la consiguiente segregación de los complejos híbridos en forma de micelas inversas en la fase orgánica y el posible exceso de ácido nucleico en la fase acuosa. En este segundo paso se concentran las micelas inversas en forma de partículas neutralizadas (ácido nucleico con lípido catiónico 25 biocompatible) separándolas en una fase orgánica que más tarde servirá como medio de mezcla con el resto de lípidos que constituirán las bicapas de las futuras nanopartículas lipídicas multilamelares.

Por otro lado, se prepara la mezcla lipídica que constituye la base estructural de la 30 estructura multilamelar basada en bicapas lipídicas. Para ello se crea una mezcla lipídica formadora de bicapas conteniendo entre sus componentes lípidos neutros manossilados que constituyen el elemento funcional que interactuará de forma específica con los macrófagos cerebrales residentes. Dichas bicapas lipídicas constituirán la estructura multilamelar capaz de compactar ácido nucleico a alta densidad. 35 Concretamente, se utiliza una mezcla de fosfolípido insaturado y colesterol,

proporcionando fluidez a las bicapas lipídicas, junto con una pequeña cantidad de lípido manosilado, el cual proporciona funcionalidad y cuenta con suficiente flexibilidad para interactuar con los receptores de manosa de la superficie de los macrófagos. Como fosfolípido insaturado, preferentemente se utiliza POPC. Como lípido manosilado se
5 selecciona preferentemente DSPE-PEG(020GS)-MAN y se incluye una cantidad de lípido manosilado comprendida entre el 5 y el 15%, en masa.

Preferentemente, se utiliza un fosfolípido pegilado basado en diesteroilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG) funcionalizado con una manosa en su
10 extremo. Para ello, se utiliza un lípido fusionado a una cadena de polietilenglicol (PEG) y un grupo reactivo ester succinimidil (NHS) en su extremo (DSPE-PEG-NHS) y se hace reaccionar el grupo -NHS con el grupo -NH₂ de p-aminofenil- α -D mannopiranosido (MAN) mediante una reacción directa que no necesita ningún agente acoplante. Para la formación de la película lipídica que más tarde constituirá la corona de la nanopartícula
15 lipídica debe retirarse el solvente orgánico que ha servido para su homogeneización. Para ello puede emplearse cualquier método conocido por el experto en la materia para la evaporación del solvente orgánico como, por ejemplo, rotavapor (vacío), gas inerte.

En sustitución del fosfolípido insaturado POPC podrían utilizarse otras fosfocolinas insaturadas de características similares en cuanto a fluidez como, por ejemplo, 1,2-
20 dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), DOPC o L- α -fosfatidilcolina (eggPC).

Asimismo, podrían utilizarse lípidos pegilados y lípidos funcionalizados con manosa basándose en la reacción del grupo reactivo ester succinimidil (NHS) con p-aminofenil-
25 α -D mannopiranosido (MAN). Ejemplos no limitantes pueden ser: DSPE-PEG-NHS, DOPE-PEG-NHS, N-(succinimidiloxi-glutaril)-L- α -fosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleoil (POPE-PEG-NHS), N-(succinimidiloxi-glutaril)-L- α -fosfatidiletanolamina, dipalmitoil (DPPE-PEG-NHS), N-(succinimidiloxi-glutaril)-L- α -fosfatidiletanolamina, 1,2-
30 bis(dimetilfosfino)etano (DMPE-PEG-NHS).

Respecto a la composición del interior multilamelar de la partícula lipídica, la cantidad de lípido catiónico biocompatible que asegura su estabilidad estructural se determina en función del ácido nucleico que se utiliza. Con el objetivo de maximizar la carga de ácido nucleico, durante el segundo paso del procedimiento, se puede suplementar la cantidad
35 de lípido catiónico biocompatible hasta extraer completamente el ácido nucleico que

haya podido quedar atrapado en la fase orgánica de la emulsión de Bligh and Dyer. La relación de los lípidos que conforman el componente funcional también puede modificarse, variando alrededor del contenido fosfolípido-PEG-MAN. El intervalo de colesterol puede abarcar entre el 10 y 40%, correspondiendo el resto al fosfolípido insaturado y al fosfolípido pegilado. La proporción de los lípidos estructurales (formadores de bicapa) y el lípido catiónico biocompatible (DC-colesterol complejante del ácido nucleico) se mantiene mayoritaria, preferentemente en una proporción de 5:1.

La fase orgánica que se obtiene con la desestabilización de la monofase de Bligh & Dyer contiene micelas inversas de lípido catiónico conteniendo el ácido nucleico en su interior. La película lipídica obtenida en el primer paso arriba descrito se disuelve en la fase orgánica de la emulsión Bligh & Dyer, formando una disolución en la que se encuentran las micelas inversas protegiendo los ácidos nucleicos del núcleo y los lípidos disueltos en fase orgánica.

A continuación, se añade una solución acuosa libre de nucleasas a la fase orgánica del paso anterior, de tal manera que el sistema se vuelve heterogéneo en forma de emulsión. Mediante la iniciación del proceso de inversión de fases, la fase orgánica conteniendo la mezcla nucleolipídica compleja queda suspendida en agua. La inversión de fases se completará tras la evaporación posterior del componente orgánico (más volátil que el agua), dando lugar a la suspensión de las nanopartículas lipídicas en fase acuosa.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener nanopartículas lipídicas, con los macrófagos cerebrales como células diana, que incluye los siguientes pasos:

1a. complejación de un ácido nucleico disuelto en agua con un lípido catiónico biocompatible en cloroformo, para formar micelas inversas mediante formación de una monofase de Bligh & Dyer por la adición de metanol hasta homogeneización;

2a. desestabilización de la monofase de Bligh & Dyer, y concentración de las partículas hidrofóbicas del paso 1a mediante la adición de cloroformo y agua;

1b. preparación de los lípidos formadores de bicapa: fosfolípido insaturado/colesterol/lípido-PEG-MAN que incluye la modificación del componente lípido-PEG-NHS mediante reacción directa de la cabeza succinimidil éster (NHS) con el grupo $-NH_2$ de p-aminofenil- α -D mannopiranosido (MAN);

- 2b. preparación de una película lipídica con los lípidos del paso 1b;
3. inserción de la película lipídica del paso 2b en la fase orgánica del paso 2a mediante disolución;
4. interacción de las micelas inversas con los lípidos formadores de bicapa, ambos presentes en la disolución del paso 3, inducida por la adición de agua a la fase orgánica;
5. extracción del disolvente orgánico y obtención de las nanopartículas lipídicas multilamelares en solución acuosa.

En este procedimiento, es especialmente interesante la manosilación que se realiza en un único paso y que no requiere la utilización de ningún agente acoplante y, especialmente, no requiere el uso de glutaraldehído.

La limpieza de las nanopartículas lipídicas se puede realizar por sedimentación (centrifugación), eliminando en el sobrenadante las vesículas lipídicas que no contienen ácidos nucleicos y los posibles ácidos nucleicos no encapsulados. Finalmente, las nanopartículas lipídicas son resuspendidas en tampón libre de nucleasas. Mediante esta sucesión de pasos, se evita el procedimiento tradicional de extrusión para homogeneizar el tamaño de las nanopartículas lipídicas, técnica que se utiliza habitualmente en el estado de la técnica, y que conduce a una elevada pérdida de carga nucleotídica en la fase acuosa.

Por otro lado, la metodología utilizada hasta la fecha para funcionalizar lípidos con manosa emplea una reacción dependiente de activación con glutaraldehído, el cual actúa como agente enlazante. Sin embargo, el glutaraldehído es desnaturizante y citotóxico. Mediante la reacción directa entre un derivado de ácido activado vía succinimida (lípidos-PEG-NHS) y una amina primaria del p-aminofenil- α -D manopiranosido para formar una amida entre ambos reactivos, se evita la utilización de este agente citotóxico. Además, la incorporación de lípidos-PEG-MAN en una etapa intermedia de su proceso de formación, permite su concentración en la superficie de la nanopartícula lipídica por exclusión de tamaño en el interior de las lamelas, obteniendo nanopartículas lipídicas núcleo-corona fuertemente funcionalizadas en superficie mediante un método integrativo, a diferencia de los métodos indirectos descritos hasta la fecha en los que la manosa es coincubada con los liposomas una vez estos han sido formados. Esta funcionalización directa favorece la propia eficacia del proceso (maximizando la carga de MAN en superficie), evitando al tiempo la autoasociación entre

las moléculas de MAN (en el interior de la partícula). Asimismo, la adición de lípidos pegilados mejora la farmacocinética, proporciona protección frente al sistema reticuloendotelial y convierte a las nanopartículas lipídicas en vehículos más específicos hacia las células diana, proporcionando una cubierta de camuflaje, y más grandes en apariencia.

5

Otro aspecto de la invención se refiere a la obtención de nanopartículas lipídicas de tipo "core-shell", o núcleo-corona, obtenidas mediante el procedimiento descrito en esta memoria. Estas nanopartículas lipídicas, al elaborarse sin la utilización de agentes acoplantes, cuyo ejemplo más paradigmático es el glutaraldehído, están, con toda seguridad, libres de este tipo de agentes citotóxicos y pueden, por lo tanto, utilizarse *in vivo* o en cultivos de células con mucha más seguridad que las nanopartículas lipídicas en cuya elaboración se utilizan agentes acoplantes.

10

Estas nanopartículas lipídicas están especialmente preparadas para interactuar con macrófagos cerebrales perivasculares y meníngeos. El "core" o núcleo contiene una carga farmacológicamente activa de un ácido nucleico y una cantidad electroequivalente de lípido catiónico biocompatible. En términos prácticos, la metodología empleada proporciona una eficiencia de encapsulación del ácido nucleico próxima al 100% mediante la formación de estructuras lamelares de tipo "cebolla" en las que el lípido catiónico biocompatible se encuentra acomplejando el ácido nucleico en el interior de las láminas acuosas formadas entre bicapas lipídicas concéntricas.

20

El ácido nucleico puede ser en general de cualquier tipo (ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico, monocatenario, bicatenario, lineal, circular, enrollado o lineal, o combinaciones de ellos) con la limitación de que su tamaño y flexibilidad le permitan mantenerse insertado en una cavidad de dimensiones nanométricas. Puede tratarse, por ejemplo, de cualquier tipo de oligonucleótido, (microARN, ARNsi, ARNm, ADN plasmídico). Asimismo, la secuencia del ácido nucleico puede incluir análogos de nucleótidos o nucleótidos modificados, con la única limitación de contener hidrofiliencia suficiente para mostrar una preferencia por la cavidad acuosa del interior de los complejos.

25

30

En cuanto al lípido catiónico biocompatible incluido en el "core" de la nanopartícula lipídica, ejemplos no limitativos son: DOTMA, DODMA, DOTAP, DMRIE, DOTIM,

35

DOGS, DORIE, MVL5, GL67, BGTC, BGSC, DC-Chol o DC-colesterol, DOEPC y derivados de etilfosfolina, DOSPA. Alternativas clásicas de lípido catiónico utilizadas en estudios modelo son DODAB, DDAB. Preferentemente, dada su disponibilidad comercial, estabilidad química y coste reducido, se seleccionan derivados catiónicos de

5 colesterol como BGTC, BGSC y, más preferentemente, DC-colesterol, un lípido natural funcionalizado con carga positiva.

El "core" de las nanopartículas lipídicas presenta una estructura multilamelar condensada (se considera que un objeto lipídico es multilamelar si tiene, al menos, 3

10 bicapas lipídicas, o lamelas). Las nanopartículas de la invención incluyen, al menos, 3 lamelas y, en la mayoría de los casos un número muy superior (ver Figura 3 (A)). La corona de las nanopartículas lipídicas, o "shell", segrega la mayoría del lípido pegilado exponiendo este polímero flexible hacia la superficie libre externa, la cual sirve como cubierta de camuflaje y protección ante la degradación, favoreciendo la interacción

15 adhesiva con los macrófagos diana: macrófagos cerebrales perivasculares y menínges. La corona de las nanopartículas lipídicas de la invención incluye:

- una fosfolina que proporcione fluidez y estabilidad a las bicapas lipídicas;
- colesterol neutro proporcionando rigidez y facilitando la interacción con biomembranas lipídicas con alto contenido en fosfatidiletanolamina (PE);

20 -un lípido pegilado (lípido-PEG-NHS-MAN) proporcionando una gran cabeza polimérica segregable a la superficie libre externa de la partícula y la capacidad funcional del p-aminofenil- α -D manopiranosido (MAN) mediante su unión al brazo flexible macromolecular (PEG) mediante el grupo puente NHS. Se aprovecha la singularidad que tienen los macrófagos diana de reconocer el azúcar manosa (presente en los

25 carbohidratos de la pared celular de numerosas bacterias) y la capacidad de las nanopartículas lipídicas tapizadas de este fosfolípido pegilado, para favorecer su adhesión con la membrana plásmatica mediante la funcionalización con la manosa en su superficie.

30 En una realización preferida, el lípido pegilado está basado en diesteroilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG-NHS-MAN).

Los lípidos pegilados incluidos en la formulación presentan una cabeza polar de tamaño macromolecular. Debido a su exclusión por tamaño en la estructura laminar, la superficie

35 externa de dichas nanopartículas lipídicas compuestas aparece tapizada de grupos

manosa, los cuales permiten la selectividad de la nanopartícula por los macrófagos meníngicos y perivasculares. Esta estructura estratificada, como si se tratase de una cebolla (lamelas interiores y superficie externa funcionalizada), es diferente a los liposomas convencionales descritos hasta la fecha, los cuales son fundamentalmente unilamelares según se obtienen por extrusión.

En una realización preferida de la invención las nanopartículas lipídicas que tienen como célula diana a los macrófagos cerebrales comprenden:

- un núcleo multilamelar formado por oligonucleótidos antisentido y DC-colesterol,
- una cubierta lipídica fluida de base estructural compuesta por fosfolípido y colesterol y un componente funcional de base lipídica pegilado y funcionalizado con un derivado de manosa;

y presentan una configuración multilamelar con alto grado de compactación, entendiéndose por multilamelar que tienen, al menos, 3 lamelas y por alto grado de compactación que el lípido catiónico biocompatible está complejando el ácido nucleico en el núcleo en una estructura tipo sándwich.

Preferentemente, los oligonucleótidos antisentido se diseñan como GapmeRs, cuya liberación en macrófagos residentes produce el silenciamiento selectivo de genes de esos macrófagos, y la cubierta lipídica multilamelar incluye POPC/colesterol/DSPE-PEG-MAN.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la depleción de macrófagos cerebrales que incluye nanopartículas lipídicas formadas por un núcleo con oligonucleótidos antisentido y DC-colesterol, y una cubierta lipídica de fosfolípido, colesterol y un componente de base lipídica pegilado y funcionalizado con un derivado de manosa. Preferentemente, los oligonucleótidos antisentido son GapmeRs, cuya liberación en macrófagos residentes produce el silenciamiento selectivo de genes de esos macrófagos, y la cubierta lipídica multilamelar está constituida por POPC/colesterol/DSPE-PEG-MAN.

Como consecuencia del procedimiento para la elaboración de estos nanoliposomas las nanopartículas lipídicas están estratificadas en una estructura núcleo-corona comprendiendo un núcleo multilamelar muy compacto con alta carga de ácido nucleico y una corona superficial de lípidos neutros y funcionalizados. En la figura 3 puede

observarse este tipo de estructura. El hecho de que las nanopartículas lipídicas de la invención sean multilamelares les confiere la ventaja de liberar lentamente su contenido una vez se liberan en el tejido *in vivo* o *in vitro*.

5 Estas nanopartículas lipídicas tienen como células diana a los macrófagos perivasculares y meníngeos cerebrales que son macrófagos residentes del cerebro con actividad fagocítica constitutiva, de origen hematopoyético, que ocupan el cerebro a una tasa constante de reposición en el espacio perivascular y meníngeo. Hasta la fecha se ha descrito que tienen un papel fundamentalmente regulador en la activación de
10 respuestas de fase aguda frente a un estímulo inmune, como son la síntesis y liberación de glucocorticoides o la respuesta febril; se han identificado como centinelas inmunes, regulando la acumulación y tráfico de macromoléculas (por ejemplo, el péptido β -amiloide), virus, bacterias y leucocitos periféricos al parénquima cerebral en distintos modelos animales de neuropatologías; se han propuesto como una importante fuente
15 de estrés oxidativo que puede estar implicado en la disfunción cerebrovascular que tiene lugar en modelos animales de Alzheimer e hipertensión; y se han identificado como principal reservorio del virus VIH en el sistema nervioso central, ocasionando diversas disfunciones neurológicas.

20 Por lo tanto, la modulación génica de estas células inmunes, que tienen un claro papel regulador de la fisiología del sistema nervioso central, mediante ácidos nucleicos con efectos farmacológicos vehiculados por nanopartículas lipídicas constituye una interesante estrategia terapéutica para el manejo de la respuesta inmune/inflamatoria que forma parte de la etiopatología de múltiples patologías neurológicas/
25 neurodegenerativas y psiquiátricas, de manera que se puede elaborar un método para el tratamiento de dichas patologías utilizando las nanopartículas lipídicas de la invención en un paciente aquejado de alguna enfermedad del sistema nervioso central. Otro aspecto de la invención se refiere a las nanopartículas lipídicas que se han descrito en esta memoria para su uso en la elaboración de un medicamento frente a enfermedades
30 neurológicas/ neurodegenerativas y/o psiquiátricas. Asimismo, la invención también se refiere a aquellas composiciones farmacéuticas que incluyen las nanopartículas lipídicas descritas en esta memoria, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una

mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

5 **Figura 1.** Esquema ilustrativo de la metodología para la preparación de las nanopartículas lipídicas, los números indican el número de cada ejemplo y los marcos de colores corresponden a los porcentajes de disolvente indicados en cada cuadro de texto específico.

10 **Figura 2.** Espectro de resonancia magnética de protón tras la síntesis del lípido manosilado DSPE-PEG-manosilado. En color rojo se han marcado las señales nuevas tras la unión con la manosa.

15 **Figura 3.** Imágenes obtenidas mediante tinción negativa por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas lipídicas complejando el ARNm (A-D) y en ausencia de ARNm (E-F).

Figura 4. Imágenes de doble inmunofluorescencia de secciones coronales de tejido cerebral de ratas.

20

Figura 5. Imágenes de hibridación "in situ" de secciones coronales de tejido cerebral de ratas con la sonda caracterizada por SEQ ID NO:3. Localización del ARNm del enzima L-PGDS-en células de localización perivascular.

25 **Figura 6.** Imágenes de hibridación "in situ" de secciones coronales de tejido cerebral de ratas con la sonda caracterizada por SEQ ID NO:3. Localización del ARNm del enzima L-PGDS en las meninges.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

30

Ejemplo 1. Elaboración del núcleo multilamelar. Figura 1 (1).

Como herramienta para la inactivación de cualquier ARNm (ARN mensajero) o ARNInc (ARN no codificante de más de 200 nucleótidos) se utilizó un LNA GapmeR diseñado previa petición y comercializado por la empresa Exiqon®. Un GapmeR es una cadena
35 de 14-16 nucleótidos de ADN monocatenario que se diseña con las regiones

flanqueantes modificadas con nucleótidos LNA (*Locked Nucleic Acid* o ácido nucleico bloqueado) para aumentar la afinidad de la cadena de ADN por el ARN diana. Al hibridarse el GapmeR con el ARN diana, se genera una estructura hueca en la región central del ADN-ARN que activa la ARNasa H de la célula y esta enzima se encarga de degradar el ARN diana.

Se seleccionó una secuencia antisentido para la inhibición del enzima L-PGDS, responsable de la síntesis de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-Prostaglandina J2. La secuencia, original y diseñada bajo petición por la empresa Exiqon®, fue: 5'-3'-
10 TACTCTTGAATGCACT (caracterizada por SEQ ID NO:1), marcada en 5' con un isómero derivado de la fluoresceína (FAM, carboxifluoresceína) emitiendo a 488nm.

Como control negativo para este experimento también se diseñó y utilizó una sonda original antisentido sin sentido ("no sense") cuya secuencia fue 5'-3'-
15 AACACGTCTATACGC (caracterizada por SEQ ID NO:2), marcada en 5' con FAM, emitiendo a 488nm.

En un vial de vidrio de 1,5 mL, se disolvieron 0,54 mg de DC-Chol (Avanti® Polar Lipids) en 90 µl de CHCl₃, se añadieron 300 µl de metanol y 90 µl de H₂O libre de ARNasas
20 conteniendo 20 nmoles de GapmeR. El contenido de ese vial se agitó formándose una monofase (corresponde al contenido 20% H₂O, 50% MeOH, 30% CHCl₃ en el diagrama Bligh&Dyer) que se dejó incubar durante toda la noche.

Ejemplo 2. Desestabilización de la monofase de Bligh&Dyer y concentración de las partículas hidrofóbicas en la fase orgánica. Figura 1 (2).

Se añadieron CHCl₃ (120 µL) y H₂O libre de nucleasas (120 µL) para reducir el porcentaje de metanol y situarse en una zona del diagrama de Bligh&Dyer (30% H₂O, 30% MeOH, 40% CHCl₃), donde los disolventes se separan en fases. Los lípidos catiónicos biocompatibles, al estar complejando el GapmeR, lo protegen y lo arrastran
30 a la fase orgánica, más densa (inferior dentro del tubo). Estas micelas no se desestabilizaron al quedar agua de hidratación entre la interacción lípido catiónico biocompatible-GapmeR.

Se mezcló en vórtex y se separaron las fases bajo centrifugación suave (800 rpm, 4
35 minutos), recuperando la fase orgánica que quedó localizada en la parte inferior del tubo

después de la centrifugación.

Ejemplo 3. Preparación de una película lipídica con lípidos neutros manosilados: POPC/colesterol/DSPE-PEG-MAN. Figura 1 (3).

- 5 Como fosfolípida fluida, se eligió para este ejemplo POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolípida) que, junto con el colesterol, se adquirió en Avanti® Polar Lipids. Para la manosilación del lípido pegilado funcionalizado con el grupo NHS, a una solución de DSPE-PEG(2000)-NHS (50 mg, 1 equiv.; (NOF Europe GmbH)) en tetrahidrofurano (THF) (6 mL) se añadió MAN (4,5 mg, 1 equiv.; 4-aminofenil α -D-manopiranosido; Sigma-Aldrich, Merck). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h y la reacción fue seguida por cromatografía en capa fina. Después, el disolvente se eliminó al vacío y el producto se utilizó sin necesidad de volver a realizar purificación.

- 15 En la figura 2, se muestra el espectro de resonancia magnética de protón tras la síntesis del lípido manosilado. En color rojo se han marcado las señales que aparecen tras la unión de la manosa al lípido pegilado DSPE-PEG. El ensayo se realizó con un espectrómetro Bruker Avance 300 (1H: 300 MHz) a 298 K usando solventes parcialmente deuterados como estándar interno.

INSTRUM	spect
PROBHD	z104275_0393
PULPROG	zg30
TD	32768
SOLVENT	CDC13
NS	32
DS	2
SWH	6009.618 Hz
FIDRES	0.366798 Hz
AQ	2.7263477 sec
RG	184.03
DW	83.200 usec

DE	6.50
TE	295.6 K
D1	1.00000000 sec
TD0	1
SFO1	300.1618010 MHz
NUC1	1H
P1	14.00 usec
SI	65536
SF	300.16000245 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00

Tabla 1. Configuración del ensayo de resonancia magnética de protón realizado según el ejemplo 3.

- 5 Se preparó una película lipídica mezclando los lípidos disueltos en cloroformo siguiendo una relación POPC/colesterol/DSPE-PEG-MAN de 52:40:8 mol%, teniendo en cuenta una ratio POPC/DC-Chol de 5,2:1. Después, se eliminó el cloroformo al vacío, quedando los lípidos formando una fina película en el fondo del vial.
- 10 **Ejemplo 4. Inserción de los lípidos de la corona en la fase orgánica del ejemplo 2. Figura 1 (4).**
Se utilizaron 210 μ L de la fase orgánica obtenida en el ejemplo 2 para disolver la película lipídica elaborada en el ejemplo 3. Se mezclaron y se incubaron durante 2 horas.
- 15 **Ejemplo 5. Obtención de las nanopartículas lipídicas. Figura 1 (5).**
Se mezclaron 210 μ L de H₂O libre de nucleasas y los 210 μ L de la fase orgánica obtenida en el ejemplo 4 y se formó una emulsión mezclando con un vórtex.

A continuación, se extrajo de la emulsión la fase orgánica (cloroformo y metanol) con un rotavapor (evaporación rotatoria) obteniendo las nanopartículas lipídicas disueltas en una fase acuosa cuyo volumen se ajustó con tampón PBS libre de nucleasas hasta un
 5 volumen final de 250µl.

Ejemplo 6. Limpieza de las nanopartículas lipídicas. Figura 1 (6).

Las nanopartículas lipídicas del ejemplo 5 se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos, para sedimentarlas y eliminar las vesículas lipídicas que no contenían GapmeR
 10 así como posibles moléculas de GapmeR que no se hubieran encapsulado por rotura de las nanopartículas.

Finalmente, el *pellet* resultante de la centrifugación se resuspendió en 250 µl de tampón PBS libre de nucleasas.
 15

Ejemplo 7. Caracterización de los liposomas mediante dispersión de luz dinámica, Potencial Zeta y TEM

Dispersión de luz dinámica (DLS): En el ejemplo 6, después de la sedimentación de las nanopartículas lipídicas por centrifugación, se obtuvieron dos fases, la primera es el sobrenadante, en el cual se localizan los liposomas menos densos porque no contienen el denso y compacto núcleo formado por lípidos catiónicos biocompatibles complejando el ácido nucleico, y la segunda es un *pellet*, en el cual se encuentran concentradas las nanopartículas lipídicas.
 20

El diámetro medio y la distribución de vesículas se midieron por dispersión de luz dinámica. Para ello, las muestras se diluyeron (1:100) en tampón PBS y se midieron a 25°C, considerando un índice de refracción medio de 1.335, en un Malvern Zetasizer NS instrument. Se considera que un índice de polidispersidad por debajo de 0,1
 25
 30 representa una muestra bastante monodispersa, es decir, homogénea. En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos en tres repeticiones para cada fase tras el paso de limpieza del ejemplo 6; entre medida y medida se dejó un tiempo de espera de 30 minutos. Las medidas realizadas a partir del *pellet* resuspendido en PBS indican que las muestras obtenidas son bastante monodispersas y que el tamaño medio de las
 35 nanopartículas lipídicas se encuentra en torno a 170 nm. Las muestras medidas de una

fracción del sobrenadante indican mayor polidispersidad y un mayor tamaño medio, de aproximadamente 193 nm. En ambos casos parecen estables con el tiempo.

	Pellet Diámetro efectivo (nm) $\pm 10\%$	Índice de polidispersidad (PDI)	Sobrenadante Diámetro efectivo (nm) $\pm 10\%$	Índice de polidispersidad (PDI)
1	168,5	0,173	191,0	0,187
2	173,7	0,199	193,5	0,236
3	172,7	0,168	195,0	0,215

- 5 **Tabla 2.** Resultados obtenidos para la medida del diámetro efectivo y el índice de polidispersidad de las fases obtenidas tras la sedimentación de las nanopartículas lipídicas (sobrenadante y *pellet*) mediante dispersión de luz dinámica.

10 **Potencial Zeta (mV):** Se realizó una medición indirecta de la carga superficial neta de las nanopartículas lipídicas midiendo el potencial zeta de sus suspensiones acuosas diluidas, en un Malvern Zetasizer NS instrument (Malvern Instruments Ltd, UK). Para ello, la muestra se colocó en una celda de electroforesis equipada con electrodos de oro, las muestras se diluyeron en una proporción 1:50 y se midieron a 25°C.

15 En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos en 5 repeticiones de cada fase (sobrenadante y *pellet*). En la medición de las nanopartículas lipídicas del *pellet*, se obtuvieron valores tanto positivos como negativos cercanos a la neutralidad, indicando que los lípidos catiónicos biocompatibles que conforman las nanopartículas lipídicas se encuentran complejando (interaccionando) los fragmentos de GapmeR de carga

20 contraria, apareciendo una compensación de cargas que da lugar a un potencial zeta esencialmente nulo. En el sobrenadante se localizan las nanopartículas lipídicas menos densas que no contienen GapmeR. En estos objetos, el exceso de lípidos catiónicos produce un exceso de carga positiva. Esto se observó en las medidas de potencial zeta del sobrenadante, las cuales presentan una carga superficial neta altamente catiónica.

25

	Pellet (mV)	Sobrenadante (mV)
1	-2,0e+00±1,7e+00	40,7±1,4
2	1,8e+00±1,7e+00	44,7±1,4
3	3,3e+00±1,7e+00	42,4±1,4
4	-2,5e-01±1,7e+00	48,9±1,4
5	-6,5e+00±1,7e+00	44,,3±1,4

Tabla 3. Potencial zeta medido en las fases obtenidas tras la sedimentación de las nanopartículas lipídicas en el ejemplo 6.

- 5 **Tinción negativa en Microscopía electrónica de transmisión (NS-TEM):** Se analizó por TEM la microestructura de las nanopartículas lipídicas con un método de tinción negativa mediante cationes uranilo (UO_2^+), los cuales marcan preferencialmente el componente nucleotídico de carga negativa. Para su examen, se combinaron volúmenes iguales de la muestra diluida en PBS y acetato de uranilo (2%) y se dejaron
- 10 incubar durante 1 min a temperatura ambiente. Se colocó una gota de esta solución en una rejilla de cobre recubierta de carbono Formvar durante 5 min. Se eliminó el exceso de líquido usando papeles de filtro. Después de secar la rejilla a temperatura ambiente durante 5 minutos, se realizaron micrografías con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 operando a 100 kV (resolución = 0.35 nm). Las micrografías se
- 15 captaron usando una cámara Megaview II.

La microscopía electrónica de transmisión empleando el método de tinción negativa es una técnica muy útil que proporciona información sobre las propiedades químicas y estructurales en muestras de liposomas o cápsulas lipídicas. El acetato de uranilo

20 presenta preferencia por grupos amino y fosfato, por lo que la alta presencia de grupos fosfato y amino en el ARN convierte esta metodología en una técnica muy adecuada para su localización. Asimismo, la presencia de grupos fosfato a nivel de la cabeza en

los fosfolípidos, también permite la tinción de membranas, pero con menor intensidad que en el caso de los ácidos nucleicos. Mediante esta técnica, se ha confirmado la multilamellaridad de las nanopartículas lipídicas de la invención y la estratificación tipo “core-shell” de dichas nanopartículas. En la figura 3 se muestran tres imágenes de tinción negativa mediante microscopía electrónica de transmisión (A, C, E). La imagen A corresponde al núcleo de una nanopartícula lipídica. Estas regiones están compuestas por moléculas de DC-Colesterol complejando GapmeR. Debido a la presencia de grupos amino en el DC-Colesterol y de grupos amino y fosfato en GapmeR, estas regiones se convierten en estructuras de mayor contraste debido a la mayor interacción con el acetato de uranilo. En esta imagen, es posible apreciar la presencia de estructuras tipo sándwich. En la gráfica B se muestra el análisis de la escala de gris en función de la distancia en una región de la imagen A (línea roja) utilizando el *software* libre ImageJ. En rojo se muestra el ajuste a una función sinusoidal con una distancia pico-pico de $9,24 \pm 0,12$ nm, lo cual es compatible con una estructura lamelar periódica formada por bicapas lipídicas de entre 4 y 5 nm de espesor, flanqueadas por láminas acuosas interlamelares de entre 5 y 4 nm de espesor donde se aloja el ARN complejado con el DC-colesterol catiónico incluido en la composición de las bicapas lipídicas. En la imagen C se muestra el mismo estudio en una nanopartícula lipídica en la que se visualiza con claridad la corona menos electrodensa, y por tanto con una cantidad reducida de ARN. Debido a la multilamellaridad de las nanopartículas lipídicas, también es apreciable periodicidad entre las diferentes lamelas que constituyen la corona, aunque se observa una distancia promedio levemente mayor que en la región del núcleo, con distancias de repetición aproximadas de $9,9 \pm 0,3$ nm (gráfica D), lo cual es esperable debido a la repulsión entre bicapas lipídicas del “shell” con menor compensación de cargas por parte del ARN que la ocurrida en el “core” compacto. También se observa cómo el contraste en estas regiones es más débil que en el “core”, puesto que el acetato de uranilo únicamente está reaccionando con los grupos fosfato de las cabezas de los fosfolípidos, y en mucha menor extensión con el ARN. A modo de control, la imagen E corresponde a un liposoma multilamelar no complejado recogido de la fase sobrenadante obtenida en el ejemplo 6. Debido a la carencia de RNA reteniendo los lípidos catiónicos en el “core”, la composición lipídica es más uniforme y la tinción con acetato de uranilo no diferencia una estratificación del tipo “core-shell” (imagen E), presentando una periodicidad de $9,9 \pm 0,3$ nm (gráfica F) que es muy similar a la observada en la región correspondiente al “shell” libre de ARN (gráfica D).

Ejemplo 8. Silenciamiento del gen del enzima Prostaglandina D sintasa lipocalina (L-PGDS)

Para producir la inhibición de un gen con un alto grado de expresión de forma constitutiva por los macrófagos perivasculares cerebrales y meníngeos, se seleccionó el gen que codifica para el enzima antiinflamatorio Prostaglandina D sintasa lipocalina (L-PGDS).

Teniendo en cuenta el tiempo necesario para que las nanopartículas lipídicas liberen su contenido dentro de los macrófagos diana, se optó por buscar una herramienta génica que presentara un tiempo de inhibición extendido, como es el caso de los GapmeRs. Como ya se ha indicado en el ejemplo 1, los GapmeRs son una nueva herramienta para la inactivación de cualquier ARNm o ARNInc. A diferencia de otros ARN de interferencia (siRNA), los GapmeRs no solo alcanzan dianas citoplasmáticas, sino también nucleares, como ARN de cadena larga no codificante (ARNInc) y todos los ARN de tamaño pequeño (ARNsn). Además, producen menos efectos indeseados, ya que no se unen al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), ni lo saturan. Una de sus principales ventajas es su alta estabilidad, debido a que todo su esqueleto es de fosforotioato, disminuyendo los efectos secundarios.

La secuencia antisentido utilizada para la inhibición del enzima L-PGDS, caracterizada por SEQ ID NO:1, se describe en el ejemplo 1 y está marcada en 5' con un isómero derivado de la fluoresceína (FAM, carboxifluoresceína) emitiendo a 488nm. La adición de este fluoróforo permite estudiar a través de técnicas de inmunofluorescencia (que se detallan a continuación) la localización del GapmeR en el cerebro de rata tras su administración por vía intracerebroventricular (icv) (detallada a continuación) encapsulado en las nanopartículas lipídicas de la invención.

Como control negativo para este ejemplo también se utilizó una sonda antisentido "no sense", caracterizada por SEQ ID NO:2, también marcada con fluoresceína.

Para la evaluación directa de la inhibición de la expresión génica de L-PGDS con el GapmeR descrito en el ejemplo 1 y encapsulado en nanopartículas lipídicas, se optó por la utilización de la técnica inmunohistoquímica de hibridación "in situ" (ISH), que consiste en marcar una hebra sencilla de ARN, denominada sonda, y permitir que se empareje con su secuencia complementaria en el ARN presente en una muestra de tejido. En

nuestro caso la sonda fue encargada a la empresa Microsynth®, y su secuencia es 5'-3': CTC ACC TGT GTT TAC TCT TGA ATG CAC TTA TCC GGT TGG GGC AGG, caracterizada por SEQ ID NO:3, y se marcó en el extremo 3' con ³³P-dATP, mediante una enzima deoxinucleotidil transferasa terminal. Por otro lado, el tejido utilizado para la prueba fue cortes de cerebro de rata (como se detalla a continuación).

Inyección intracerebroventricular (ICV): Estos experimentos se realizaron en ratas Wistar. Para la realización de las inyecciones ICV, se utilizaron coordenadas referidas al ventrículo lateral derecho, se anestesió a los animales con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina (2,5:1, mg/kg, s.c.) y se montaron en el marco estereotáxico. Las nanopartículas lipídicas que contenían, respectivamente, GapmeR, antisentido y su vehículo (H₂O libre de nucleasas) se infundieron lentamente en un volumen de 25 µL durante 10 minutos usando una jeringa Hamilton (Bonaduz, AG Switzerland®) y una aguja 26 GA a través de un inyector estereotáxico motorizado (Stoelting 53311®) en el ventrículo lateral derecho.

Inmunofluorescencia: Los animales (ratas Wistar) fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital. Inmediatamente después el cerebro fue extraído, congelado en hielo seco y almacenado a -80°C. Se cortaron secciones coronales de tejido cerebral de 14 µm de espesor y se colocaron en portaobjetos. Primero fueron objeto de tres lavados con KPBS (tampón fosfato salino con potasio) 0,02M (pH= 7,4), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar la autofluorescencia se incubaron con glicina 10mM, durante 20 minutos a temperatura ambiente, recibieron otros tres lavados de KPBS e inmediatamente fueron bloqueados con BSA (albúmina de suero bovino) 10%, disuelta en KPBS con tritón 0,1%, durante 30 minutos. Los cortes se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (ab64693) antirreceptor de manosa (CD206), durante toda una noche, diluidos en la solución de bloqueo; tras 3 lavados con KPBS recibieron los correspondientes anticuerpos secundarios (Alexa Fluor® 555 (A31572)), durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados con KPBS, y un último lavado con agua desionizada, durante 5 minutos. Después de secarlos, los cortes se montaron en portas con medio de montaje Fluoroshield® (Sigma Aldrich) que incluía 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Las secciones coronales se cubrieron con cubreobjetos y se congelaron a -20°C o se visualizaron inmediatamente en un microscopio de epi-fluorescencia TI-FL Epi-fl Illuminator® de alto rendimiento Nikon Eclipse Ti Series.

Las imágenes de la figura 4, de doble inmunofluorescencia, indican la presencia de los GapmeR (marcados en verde) en los macrófagos perivasculares (A) y menígeos (B) (marcados en rojo). La tinción DAPI (en azul), que identifica núcleos celulares, permite
5 observar cómo hay presencia de GapmeR a nivel tanto nuclear como citoplasmático. Estos resultados confirman que los GapmeR han sido incorporados por los macrófagos diana.

Hibridación “in situ” (ISH): Los animales (ratas Wistar) fueron sacrificados con una
10 sobredosis de pentobarbital. Inmediatamente después el cerebro fue extraído, congelado en hielo seco y almacenado a -80°C. Se cortaron secciones coronales de tejido cerebral de 14 µm de espesor y se colocaron en portaobjetos tratados con 3-aminopropil-trietoxisilano, preservándolas a -40°C. Se fijaron los tejidos con paraformaldehído (PFA) al 4% y se trataron con la proteasa pronasa para facilitar la
15 accesibilidad de la sonda al ARNm de interés. A continuación, se cubrieron los tejidos con el tampón de hibridación que contiene, aproximadamente, 1,5 nM de la sonda cuya secuencia está caracterizada por SEQ ID NO:3 y está marcada con P radioactivo y se incubaron a 42°C, durante 24 h. Después, se lavaron las secciones hibridadas y se expusieron a una película fotográfica durante 1-4 semanas. A continuación, se
20 analizaron los autorradiogramas y se obtuvieron las imágenes en un microscopio de epifluorescencia TI-FL Epi-fl Illuminator® de alto rendimiento Nikon Eclipse Ti Series.

En las figuras 5 y 6, se muestran imágenes de ISH en las que se aprecia la presencia de ARNm para la L-PGDS (puntos y manchas negras) en células de localización
25 perivascular (figura 5) y en las meninges (figura 6), en los cortes de cerebro de animales tratados con liposomas cargados con solo el vehículo de los GapmeR (control) (A) y animales que han recibido GapmeR antisentido “no sense” como control negativo (B). En los cortes que corresponden a animales que han recibido nanopartículas lipídicas con el GapmeR descrito en el ejemplo 1 (C), se aprecia una clara ausencia/reducción
30 en la señal para el ARNm de L-PGDS, lo que confirma su inhibición.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas lipídicas de tipo núcleo/corona que incluye los siguientes pasos:
- 5 1a. complejación de un ácido nucleico disuelto en agua con un lípido catiónico biocompatible en cloroformo, para formar micelas inversas mediante formación de una monofase de Bligh & Dyer por la adición de metanol hasta homogeneización;
- 2a. desestabilización de la monofase de Bligh & Dyer, y concentración de las partículas hidrofóbicas del paso 1a mediante la adición de cloroformo y agua;
- 10 1b. preparación de los lípidos formadores de bicapa: fosfolípido insaturado/colesterol/lípido-PEG-MAN que incluye la manosilación del componente lípido-PEG-NHS mediante reacción directa de la cabeza succinimidil éster (NHS) con el grupo -NH₂ de p-aminofenil- α -D mannopiranosido (MAN);
- 2b. preparación de una película lipídica con los lípidos del paso 1b;
- 15 3. inserción de la película lipídica del paso 2b en la fase orgánica del paso 2a mediante disolución;
4. interacción de las micelas inversas con los lípidos formadores de bicapa, ambos presentes en la disolución del paso 3, inducida por la adición de agua a la fase orgánica;
5. extracción del disolvente orgánico y obtención de las nanopartículas lipídicas multilamelares en solución acuosa;
- 20 y en el que la manosilación no requiere un agente acoplante.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que no se realiza homogeneización por extrusión del tamaño de las nanopartículas lipídicas obtenidos en el paso 5.
- 25 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que se añaden los siguientes pasos:
6. Limpieza por sedimentación de las nanopartículas lipídicas y eliminación de las vesículas lipídicas sin ácido nucleico y del ácido nucleico no encapsulado.
- 30 7. Resuspensión del *pellet* de nanopartículas lipídicas en solución acuosa.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el lípido catiónico biocompatible se selecciona del grupo formado por: 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), 1,2-dioleiloxi-3-dimetilaminopropano (DODMA),
- 35 dioleoiloxi-trimetilamonio propano (DOTAP), bromuro de amonio 1,2-dimiristiloxi-propil-

3-dimetil-hidroxi etil amonio (DMRIE), cloruro de 1-[2-(oleoiloxi)etilo]-2-oleil-3-(2-hidroxi)imidazolinio (DOTIM), dioctadecil-amido-glicilo-espermina (DOGS), bromuro de 1,2-dioliiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)etilamonio (DORIE), N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-amino-propil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-
 5 benzamida (MVL5), N4-colesteril-espermina HCl Sal (GL67), bis-guanidium-tren-colesterol (BGTC), bis-guanidinium-espermidine-colesterol (BGSC), 3 β -[N-(N',N'-dimetilamino)etano]-carbamoil]colesterol clorhidrato (DC-Chol o DC-colesterol), cloruro de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina y derivados de etilfosfocolina (DOEPC), 2,3-dioleiloxi-N-(2-(esperminocarboxamido)etil)-N,N-dimetil-1-propanaminium
 10 trifluoroacetato (DOSPA), bromuro de dioctadecil-dimetilamonio (DODAB), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano (DSTAP).

5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que lípido catiónico biocompatible seleccionado es DC-colesterol.

15

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el ácido nucleico es un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico, monocatenario, bicatenario, lineal, circular, enrollado, o combinaciones de los mismos, un oligonucleótido, microRNA, siRNA, mRNA o DNA plasmídico.

20

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el ácido nucleico es un GapmeR.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el fosfolípido insaturado del paso 1b se selecciona entre las fosfocolinas insaturadas dioleoil-glicerofosfocolina (DOPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), L- α -fosfatidilcolina (eggPC), o palmitoil-oleoil-glicerofosfocolina (POPC).

25

9. Procedimiento según la reivindicación 8 en el que el fosfolípido insaturado seleccionado es POPC.

30

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el lípido pegilado del paso 1b se selecciona del grupo formado por DSPE-PEG-NHS, DOPE-PEG-NHS, N-(succinimidiloxi-glutaril)-L- α -fosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleoil (POPE-PEG-NHS), N-(succinimidiloxi-glutaril)-L- α -fosfatidiletanolamina, dipalmitoil

35

(DPPE-PEG-NHS), N-(succinimidiloxi-glutaril)-L- α -fosfatidiletanolamina, 1,2-bis(dimetilfosfino)etano (DMPE-PEG-NHS).

5 11. Procedimiento según la reivindicación 10 en el que el lípido seleccionado es es diesteroilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG(2000)-NHS).

12. Nanopartículas lipídicas con los macrófagos cerebrales como células diana obtenidas mediante el procedimiento definido por cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

10

13. Nanopartículas lipídicas con los macrófagos cerebrales como células diana que contienen:

- un núcleo formado por:

- un ácido nucleico, y

15

- un lípido catiónico biocompatible,

- una corona formada por:

- un fosfolípido insaturado y colesterol, y

- un componente de base lipídica pegilado y funcionalizado con un derivado de manosa,

20

caracterizadas por ser multilamelares con alto grado de compactación, entendiéndose por multilamelares que tienen, al menos, 3 lamelas y por alto grado de compactación que el lípido catiónico está complejando el ácido nucleico en el núcleo en una estructura tipo sándwich.

25

14. Nanopartículas lipídicas según reivindicación 13 en las que el lípido catiónico biocompatible se selecciona del grupo formado por: 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), 1,2-dioleiloxi-3-dimetilaminopropano (DODMA), dioleiloxi-trimetilamonio propano (DOTAP), bromuro de amonio 1,2-dimiristiloxi-propil-3-dimetil-hidroxi etil amonio (DMRIE), cloruro de 1-[2-(oleoiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxi)imidazolinio (DOTIM), dioctadecil-amido-glicilo-espermina (DOGS), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi-etilamonio (DORIE), N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-amino-propil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (MVL5), N4-colesteril-espermina HCl Sal (GL67), bis-guanidinium-tren-colesterol (BGTC), bis-guanidinium-espermidine-colesterol (BGSC), 3 β -[N-(N',N'-dimetilamino)etano]-carbamoil]colesterol clorhidrato (DC-Chol o DC-colesterol), cloruro

35

de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina y derivados de etilfosfocolina (DOEPC), 2,3-dioleiloxi-N-(2-(esperminecarboxamido)etil)-N,N-dimetil-1-propanaminium trifluoroacetato (DOSPA), bromuro de diactadecil-dimetilamonio (DODAB), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano (DSTAP).

5

15. Nanopartículas lipídicas según la reivindicación 14 en las que lípido catiónico biocompatible seleccionado es DC-colesterol.

10 16. Nanopartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 en las que el ácido nucleico se selecciona entre un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico, monocatenario, bicatenario, lineal, circular, enrollado, o combinaciones de los mismos, un oligonucleótido, microARN, ARNsi, ARNm, o ADN plasmídico

15 17. Nanopartículas lipídicas según la reivindicación 16 en las que el ácido nucleico es una Gapmer.

20 18. Nanopartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 13-17 en las que el fosfolípido insaturado de la corona se selecciona entre las fosfocolinas insaturadas dioleoil-glicerofosfocolina (DOPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), L- α -fosfatidilcolina (eggPC), o palmitoil-oleoil-glicerofosfocolina (POPC).

25 19. Nanopartículas lipídicas según la reivindicación 18 en las que el fosfolípido insaturado es POPC.

25

20. Nanopartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 13-19 en las que el componente de base lipídica pegilado se selecciona del grupo formado por DSPE, DOPE, POPE, DPPE, DMPE.

30 21. Nanopartículas lipídicas según la reivindicación 20 en las que el componente de base lipídica seleccionado es DSPE.

22. Nanopartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 13-21 en las que el derivado de manosa es p-aminofenil- α -D manopiranosido.

35

23. Nanopartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 12-22 en las que la proporción fosfolípido insaturado/colesterol/lípido manosilado es de 45-85/10-40/5-15 por ciento, en masa, respectivamente.
- 5 24. Nanopartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 12-23 para su uso en la elaboración de un medicamento frente a enfermedades neurológicas/neurodegenerativas y/o psiquiátricas.
- 10 25. Composición farmacéutica que incluye las nanopartículas lipídicas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 12-23 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
26. Kit para la depleción de macrófagos cerebrales que incluye las nanopartículas lipídicas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 12-23.
- 15 27. Kit según la reivindicación 26 en el que el ácido nucleico de las nanopartículas lipídicas es un GapmeR.

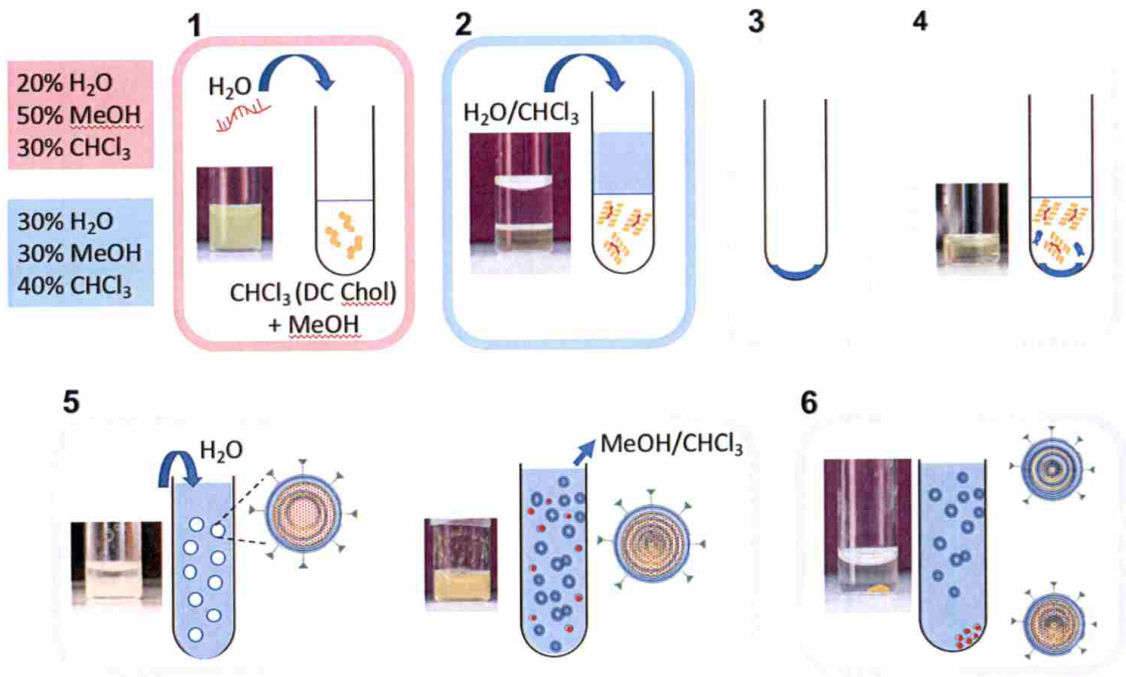


Fig. 1

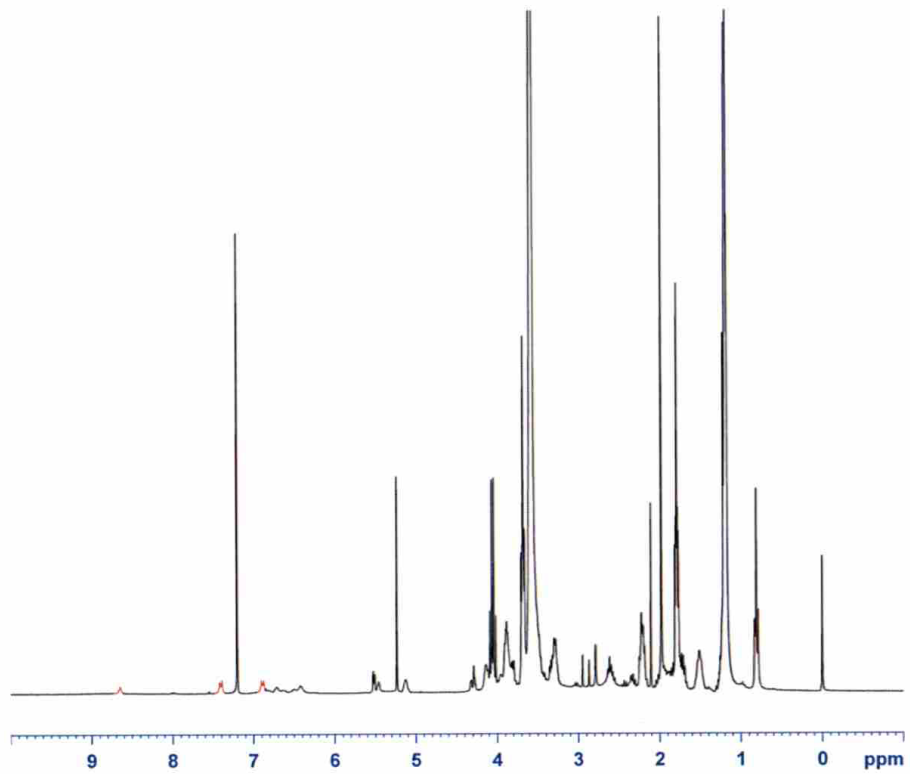


Fig. 2

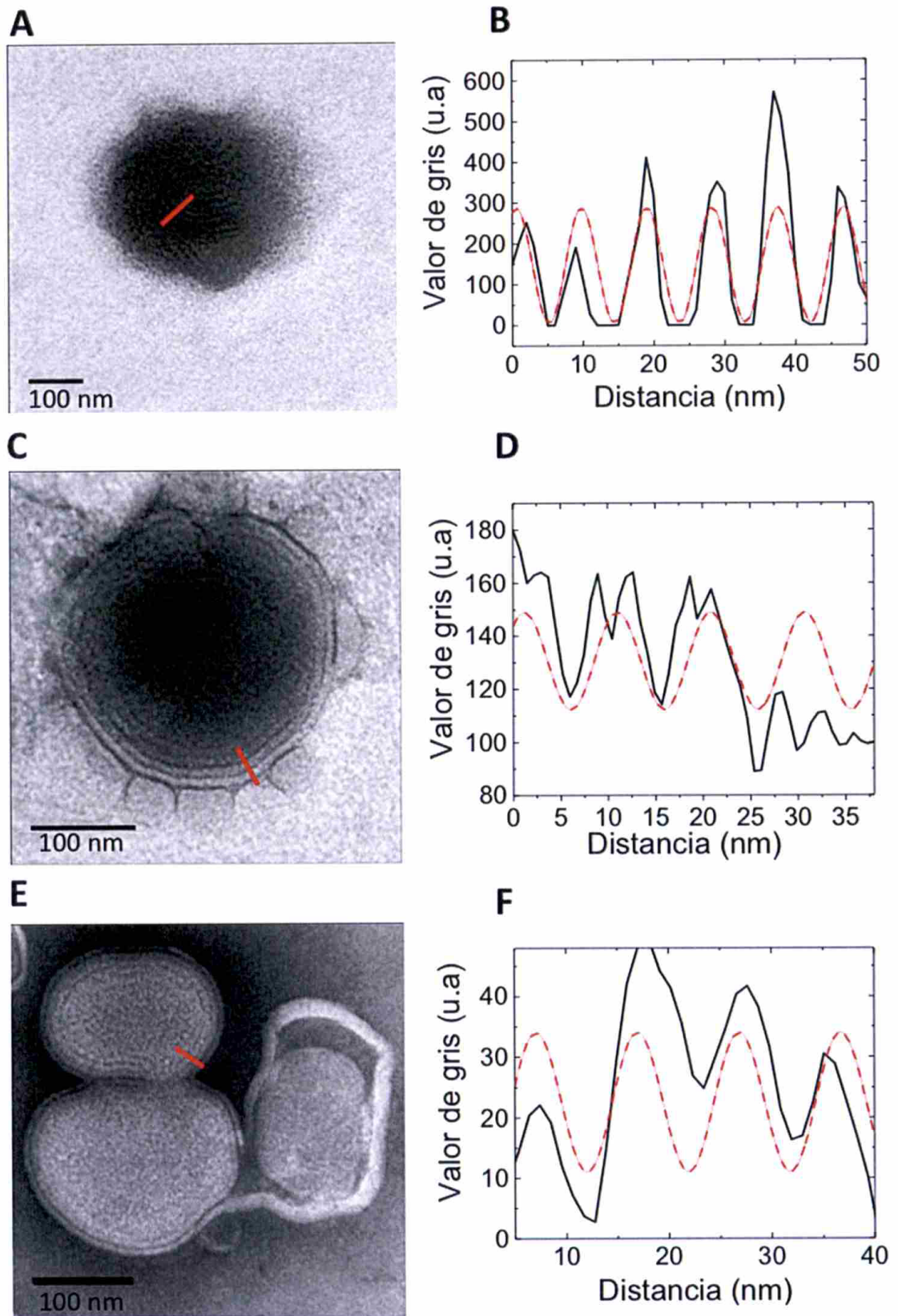


Fig. 3

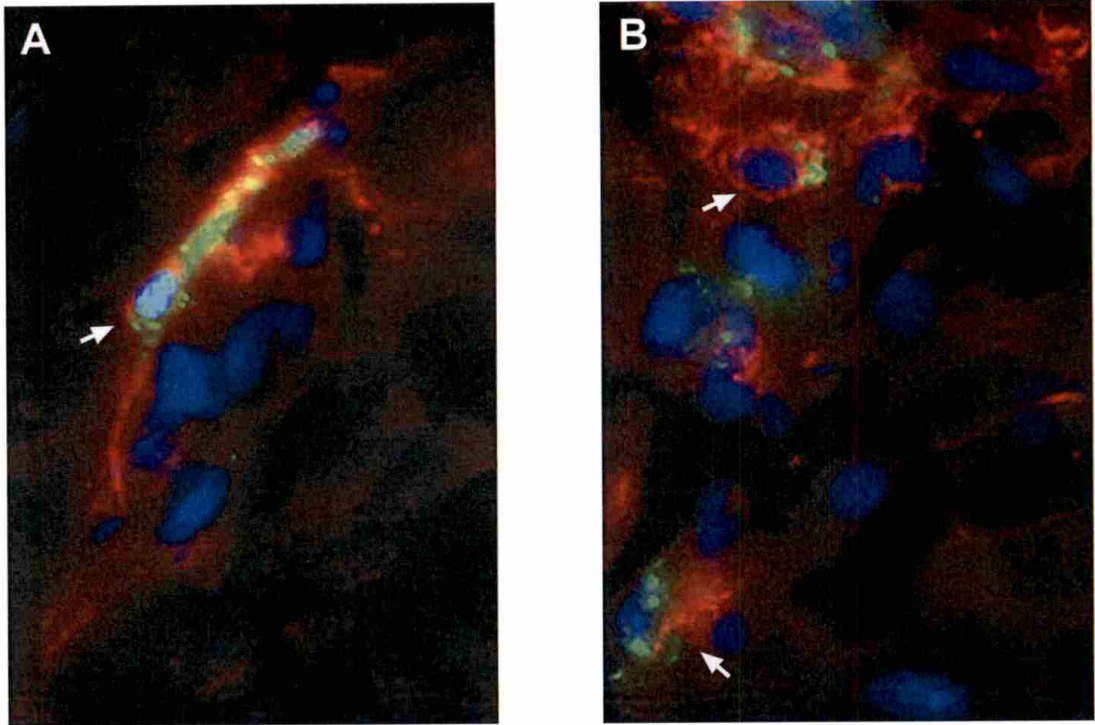


Fig. 4

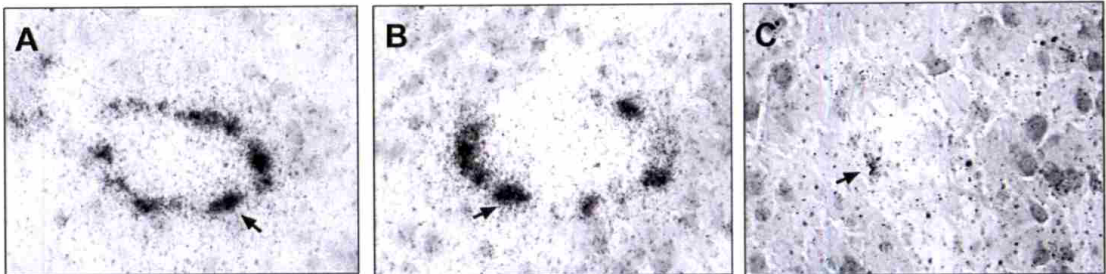


Fig. 5

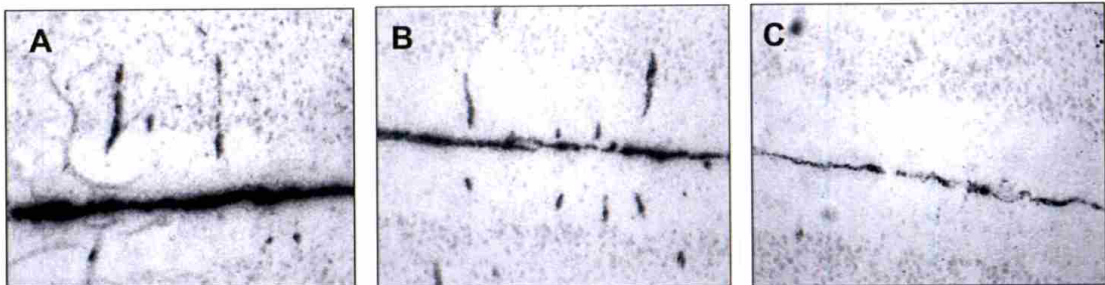


Fig. 6.



- ②1 N.º solicitud: 201800272
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 12.12.2018
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D, A	KHEIROLOMOOM AZADEH et al. Multifunctional Nanoparticles Facilitate Molecular Targeting and miRNA Delivery to Inhibit Atherosclerosis in ApoE(-/-) Mice.. ACS nano United States, 22/09/2015, vol. 9, págs 8885-8897 [en línea] [recuperado el 25/01/2019], ISSN 1936-086X, <DOI: doi:10.1021/acsnano.5b02611 pubmed: 26308181>, especialmente páginas 8886-8887, 8894-8895; figura 1.	1-11, 13-27
D, A	ES 2638309T T3 (NLIFE THERAPEUTICS S L) 19/10/2017, especialmente páginas 2, 24-25, 46	1-11, 13-27
D, A	DU DAN et al. The role of glucose transporters in the distribution of p-aminophenyl-alpha-D-mannopyranoside modified liposomes within mice brain. Journal of Controlled Release, 28/05/2014, vol. 182, páginas 99-110 [en línea] [recuperado el 25/01/2019]. , ISSN 1873-4995, <DOI: doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.006>, especialmente páginas 99-100.	1-11, 13-27
D, A	KAWAKAMI S et al. Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes.. Gene therapy England, 31/01/2000, vol. 7, páginas 292-299 [en línea][recuperado el 25/01/2019], ISSN 0969-7128 (Print), <DOI: pubmed:10694809>, especialmente páginas 292-293, 297-298	1-11, 13-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

D: citados por el solicitante en la descripción de la solicitud

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-11, 13-27

Fecha de realización del informe
25.01.2019

Examinador
J. Collado Martínez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/113 (2010.01)

A61K47/44 (2017.01)

A61K48/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

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

C12N, A61K, B82Y

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

EPODOC, INVENES, WPI, TXPCN, TXPSPJ, TXPSPK, TXPUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP