

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de octubre de 2017 (12.10.2017) **WIPO | PCT**

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/174847 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

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

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070205

(22) Fecha de presentación internacional:

4 de abril de 2017 (04.04.2017)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 201630417 5 de abril de 2016 (05.04.2016) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio Emprendia - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela - La Coruña (ES). **UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO - EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA (UPV/EHU)** [ES/ES]; Barrio Sarriena, S/N, 48940 Leioa (ES).

(72) Inventores: **SÁNCHEZ BARREIRO, Alejandro**; Edificio Emprendia - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela - La Coruña (ES). **FERNÁNDEZ PIÑEIRO, Inés**; Edificio Emprendia - Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela - LA CORUÑA (ES). **BADIOLA, Iker**; Barrio Sarriena, S/N, 48940 Leioa, Vizcaya (ES).

MÁRQUEZ, Joana; Barrio Sarriena, S/N, 48940 Leioa, Vizcaya (ES).

(74) Mandatario: **VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**; Paseo de la Castellana 93, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: NOVEL VEHICLES FOR THE TRANSFECTION OF miRNAs

(54) Título : NUEVOS VEHÍCULOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE miRNAs

(57) Abstract: The invention relates to a nanoparticle comprising: (i) between 60 wt.-% and 99 wt.-% sorbitan ester, relative to the total weight of the nanoparticle; (ii) a positively charged substance; and (iii) an miRNA. The invention also relates to the methods for producing same and to the uses thereof, particularly for therapeutic uses, such as cancer treatment.

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



WO 2017/174847 A1

NUEVOS VEHÍCULOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE miRNAs

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

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

embargo, y pese a que se han modificado genéticamente para eliminar su carga virulenta, la seguridad de estos vectores siempre despierta preocupación.

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

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

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

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

a través de la membrana celular.

El uso de vectores no virales mencionados arriba reduce estos problemas, sin embargo, especialmente en el caso de sistemas nanométricos, crea otras dificultades. El sistema reticuloendotelial (RES) absorbe rápidamente los sistemas nanométricos, y es la causa de la escasa estabilidad *in vivo* (y por tanto, escasa eficacia) de muchos de ellos (RINKENAUER, A.C., PRESS, A.T., RAASCH, M., PIETSCH, C., SCHWEIZER, S., SCHWORER, S., RUDOLPH, K.L., MOSIG, A., BAUER, M., TRAEGER, A. y SCHUBERT, U.S., **2015**. Comparison of the uptake of methacrylate-based nanoparticles in static and dynamic *in vitro* systems as well as *in vivo*. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 216, pp. 158-168; SADAUSKAS, E., WALLIN, H., STOLTENBERG, M., VOGEL, U., DOERING, P., LARSEN, A. y DANSCHER, G., **2007**. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Particle and fibre toxicology*, 4, pp. 10). El RES comprende células fagocitarias como los monocitos o los macrófagos, por ejemplo, las células de Kupffer. Aunque es generalmente aceptado que existe una correlación entre la carga superficial positiva de la nanopartícula y una menor absorción por parte de las células fagocitarias, no se conoce con exactitud qué factores influyen en esta absorción, lo que dificulta la predicción sobre el tipo de sistemas nanométricos que tendrán una estabilidad adecuada *in vivo*.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

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

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

Figura 2. Demostración del efecto terapéutico *in vivo*. Regulación clínica de la metástasis de

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

Figure 3. Demostración del efecto terapéutico *in vivo*. Análisis histológico. Se tiñeron con hematoxilín-eosin secciones de los hígados evaluados en la figura 2, y se cuantificó bajo el microscopio el área ocupada por el tumor. Los distintos grupos se relacionaron con el grupo control (grupo 1 tratado con placebo) mediante el test-T. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) se marcan con *. También se comparó el grupo 2 (tratados con SP80-OA-CS-miRNA-20a) con el grupo 5 (tratados con SP80-OA-CS sin miRNA) y su diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) indicada con +.

Figura 4. Gel de electroforesis que confirma la existencia de una asociación efectiva entre un miRNA o un plásmido (pEGFP), y las nanopartículas preparadas en el ejemplo 2. 1) banda correspondiente a pEGFP libre (200 $\mu\text{g/ml}$), 2) banda correspondiente a Nanopartículas asociadas con pEGFP 200 $\mu\text{g/ml}$, 3) banda correspondiente a miR-20a libre (5 $\mu\text{g/ml}$), 4) banda correspondiente Nanopartículas asociadas con miR-20a 50 $\mu\text{g/ml}$ (según la invención, 5) banda de la mezcla de Nanopartículas y miR-20a 100 $\mu\text{g/ml}$ (no asociados).

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

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

Figura 7. Demostración del efecto terapéutico *in vivo* para la segunda prueba de concepto

(Ejemplo 4). Análisis histológico. Se tiñeron con hematoxilin-eosin secciones de los hígados evaluados y se cuantificó bajo el microscopio el área ocupada por el tumor. Los distintos grupos se relacionaron con el grupo control (grupo 1 tratado con placebo) mediante el test-T. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) se marcan con *. También se comparó el grupo 2 (tratados con SP80-OA-CS-miRNA-20a) con el grupo 5 (tratados con SP80-OA-CS sin miRNA) y su diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) indicada con +.

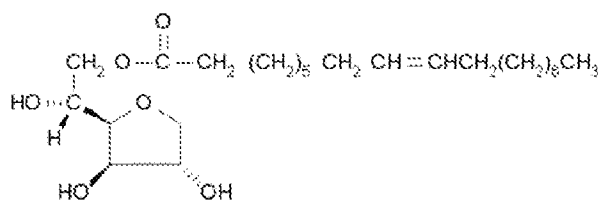
Figura 8: El análisis de transferencia de Western de ARHGAP1 y E2F1 valida el papel de miR-20a en el patrón de expresión de dos de las dianas predichas. Se realizaron análisis en 5 condiciones diferentes: i) LSEC de hígados sanos, ii) LSEC de hígados colonizados por el tumor, iii) LSEC de hígados colonizados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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

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

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



Span-80®

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

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

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

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

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

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

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

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

Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes en peso que se indican en el presente texto se calculan con referencia a la suma de todos los componentes añadidos a la mezcla en la formación de la nanopartícula, con excepción de los disolventes. Por ejemplo, para una

nanopartícula SP80-OA-HA-miR-20a, el porcentaje en peso de SP80 serán los gramos de SP80 añadidos para la preparación de la nanopartícula, multiplicado por cien, y dividido entre la suma de gramos de SP80, OA, HA y miR-20a añadidos para la preparación de la nanopartícula.

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

Componentes de las nanopartículas de la invención

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

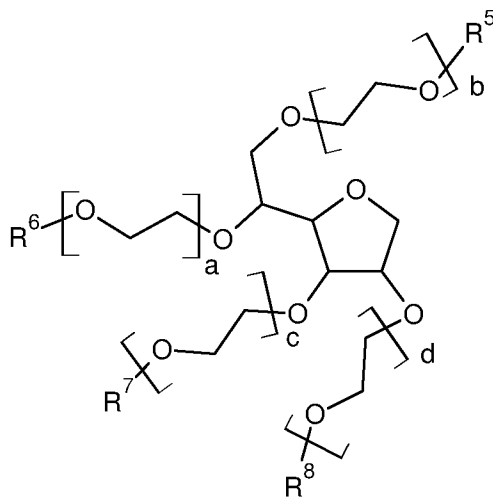
Se entiende por “ésteres de sorbitán” los derivados esterificados del sorbitán donde los grupos éster poseen un sustituyente seleccionado de entre alquilo, alquenilo y alquinilo. Los ésteres de sorbitán incluyen derivados en los que uno, dos, tres o cuatro grupos hidroxilo están esterificados, e incluso incluyen derivados esterificados en los que una molécula de éster está presente por cada dos moléculas de sorbitán (en cuyo caso se nombran con el prefijo “sesqui-”). Así, por ejemplo, el monooleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultado de la esterificación de un grupo hidroxilo con el ácido oleico; el trioleato de sorbitán es el éster de sorbitán resultante de la esterificación de tres grupos hidroxilo del sorbitán con el ácido oleico. Existen muchos tipos distintos de ésteres de sorbitán atendiendo al número de hidroxilos esterificados, la estructura del éster, la mezcla de anhidrosorbitol, y otros factores. El experto en la materia puede elegir entre distintos tipos dentro del ámbito de la invención y no está limitado a un tipo específico.

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

Tween® 60 (Polioxietilensorbitan monoestearato) o Tween® 80 (Polioxietilensorbitan monooleato).

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

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



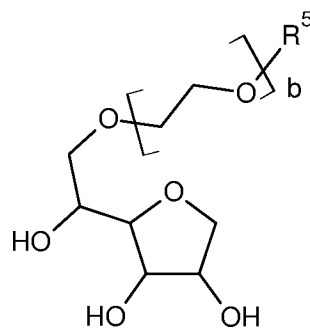
Fórmula I

en donde

cada uno de R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, $-(C=O)$ -alquilo C_1 - C_{40} , $-(C=O)$ -alquenilo C_2 - C_{40} , $-(C=O)$ -alquinilo C_2 - C_{40} , con la condición de que al menos uno de R^5 , R^6 , R^7 y R^8 no es $-H$; y cada uno de a , b , c y d es independientemente un número entre 0 y 100.

Aquellos más habituales son los comercialmente disponibles y suelen corresponder a un alquilo lineal que comprende entre 2 y 20 átomos de carbono, por ejemplo, uno con 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono, o a un grupo alquenilo lineal que comprende entre 4 y 25 átomos de carbono. Así, un ejemplo puede ser un grupo alquenilo de fórmula $-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-$ CH₃, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10. Uno habitualmente utilizado aquél en el que n es 7 y m es 7, correspondiente al ácido oleico. Como se puede ver, los bloques de polioxietileno son opcionales, y cada uno de a, b, c y d pueden ser 0. En el caso de incluir dichos bloques de polioxietileno, la suma de a, b, c y d puede ser, por ejemplo, de entre 10 y 50 o de entre 10 y 30 o de entre 15 y 30. Por ejemplo, en el caso del Tween® 80 (Polioxietilensorbitán monooleato) a, b, c y d suman 20.

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



Fórmula II

en donde

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en $-(C=O)$ -alquilo C₁-C₄₀ y $-(C=O)$ -alquenilo C₂-C₄₀; y

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

De nuevo, se prefiere uno en donde R⁵ es un alquenilo de la fórmula $-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-$ CH₃, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10.

La proporción de ésteres de sorbitán en las nanopartículas se sitúa entre el 60% y el 99% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula. Proporciones típicas en las que se

encuentran los ésteres de sorbitán son entre el 80% y el 98% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula, por ejemplo, entre el 85% y el 95%. La proporción de los ésteres de sorbitán suele ser mayor del 87% en peso con respecto al peso total de la nanopartícula.

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

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

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

cada uno de R^{10} , R^{11} y R^{12} se selecciona independientemente del grupo que consiste en

–H, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 , alquinilo C_2-C_4 , y fenilalquilo C_7-C_{15} ;

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

p es 0 o 1;

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

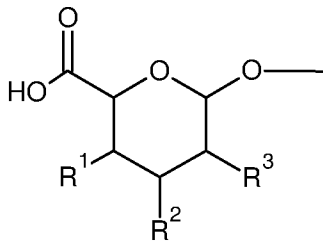
La sustancia cargada negativamente se puede añadir en proporciones que van desde el 1% hasta el 39% en peso con respecto al peso total de las nanopartículas. Cantidades preferidas oscilan entre el 2% y 20%, típicamente entre el 3% y el 12% o entre el 2% y 9% o entre el 3% y el 8%, en peso con respecto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

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

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

Los polímeros aniónicos son preferiblemente polisacáridos. Existe una gran variedad de estos polisacáridos a disposición del experto en la materia, y que se utilizan frecuentemente en este campo. Una variedad preferida son aquellos que contienen un grupo carboxilo ($-COOH$) o sulfato ($-SO_3H$) en el monómero que se repite. Se han mostrado especialmente adecuados para la presente invención aquellos polisacáridos que tienen al menos un ácido glucurónico en la estructura que se repite. Por ejemplo, dicha sustancia cargada negativamente puede comprender un polisacárido cuya unidad repetitiva tiene la fórmula $[X-Y-(Z)_n]$ en donde n es 0 o 1; X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; con la condición de que al menos uno de X, Y y Z comprende un azúcar ácido y en donde los grupos X, Y y Z se unen entre sí a través de enlaces $-O$ -glucosídicos. De acuerdo con una realización de la invención, dicho azúcar ácido se selecciona del grupo formado por los ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos,

ácidos aldáricos y mezclas de los mismos. Por ejemplo, Y puede comprender un azúcar ácido, por ejemplo, un ácido urónico. Un ejemplo no limitativo de dicho ácido urónico puede ser uno de la fórmula III



Fórmula III

en donde

cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en – H, –OH, –O–, –OR⁴, N(H)–R⁴ y –O–SO₃, con la condición de que al menos uno de R^1 , R^2 y R^3 sea –O–,

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

en donde R^4 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁–C₄, alquenilo C₂–C₄, alquinilo C₂–C₄, –(C=O)–alquilo C₁–C₄, –(C=O)–alquenilo C₂–C₄, –(C=O)–alquinilo C₂–C₄.

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

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

El hialuronano es un polímero lineal que comprende la repetición de una estructura de disacárido formada por la adición alterna de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos alternando enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glucosídicos. En el contexto de la presente invención, se puede emplear ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos moleculares.

El ácido hialurónico de elevado peso molecular es comercialmente disponible, mientras que el de peso molecular inferior puede obtenerse mediante la fragmentación del ácido hialurónico de elevado peso molecular, utilizando, por ejemplo, una enzima hialuronidasa. El término

“hialurónico, ácido hialurónico, hialuronano” tal como se utiliza en la presente descripción incluye o bien el ácido hialurónico o bien una base conjugada del mismo (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina del ácido hialurónico que incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, sales orgánicas tales como sales de aminoácidos básicos a pH neutro, preferiblemente dichas sales son farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la invención, la sal alcalina es la sal de sodio del ácido hialurónico.

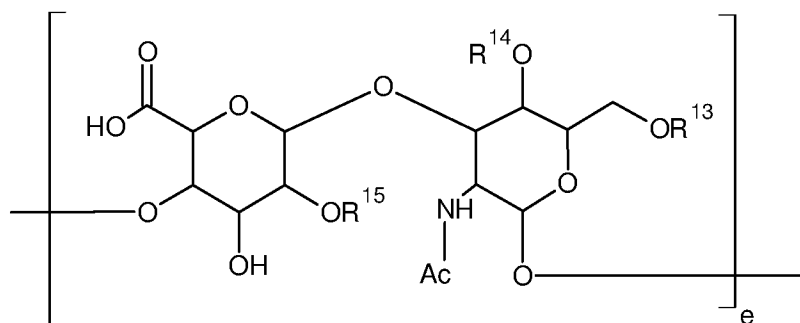
La familia de los ácidos polisiálicos, término que incluye al ácido colomínico, se encuentra integrada por polímeros lineales constituidos por residuos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac; también conocido como ácido siálico), un constituyente natural de células y tejidos, unidos por enlaces glicosídicos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

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

La heparina es una sustancia de origen natural de la familia de los glicosaminoglicanos cuya estructura química comprende la repetición de unidades monoméricas disacáridas de ácido 2-O sulfo--L-idurónico y 2-deoxi-2-sulfamido--D-glucopiranosil-6-O-sulfato. En el contexto de la presente invención, es posible emplear tanto la heparina fraccionada como la no fraccionada. La heparina tradicional o no fraccionada se distingue claramente de la heparina fraccionada o de bajo peso molecular. La primera de ellas es una sustancia natural presente en todos los vertebrados. Ambos tipos de heparina se pueden utilizar en forma de base libre o en forma de sal, como por ejemplo su sal sódica o cálcica. La heparina fraccionada o de bajo peso molecular se produce por despolimerización química o enzimática de heparinas convencionales. Ejemplos de este tipo de heparinas son enoxaparina, parnaparina, dalteparina y nadroparina, así como sus sales tales como las sales de sodio y calcio. Los derivados de heparina también pueden ser empleados en la composición de los sistema nanoparticulares de la presente invención. Estos derivados son conocidos en el estado de la técnica y se originan como consecuencia de la reactividad de los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula.

Así, heparinas N-acetiladas, O-descarboxiladas, oxidadas o reducidas son ampliamente conocidas.

El sulfato de condroitina es un glucosaminoglucano (GAG) sulfatado compuesto por una cadena de azúcares alternados. Se encuentra normalmente unido a proteínas como parte de un proteoglucano. En el contexto de la presente invención, el término “sulfato de condroitina” incluye todos sus diferentes isómeros y derivados, así como combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se selecciona entre las siguientes sustancias y combinaciones de las mismas, resumidas en la fórmula IV



IV

- sulfato de condroitina A que está sulfatado predominantemente en el carbono 4 del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) y que también se conoce como sulfato de 4-condroitina ($R^{13}=H$, $R^{14}=SO_3H$ y $R^{15}=H$)

- sulfato de condroitina B que se denomina también sulfato de dermatano. Esta sustancia está compuesta por unidades de repetición lineales que contienen N-acetilgalactosamina y o bien ácido L-idurónico o bien ácido glucurónico, y cada disacárido puede estar sulfatado una vez o sulfatado dos veces. Está presente mayoritariamente en la piel, pero también se encuentra en vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendones y pulmones.

- sulfato de condroitina C que está sulfatado predominantemente en el carbono 6 del azúcar GalNAc y que se conoce también como sulfato de 6-condroitina ($R^{13}=SO_3H$, $R^{14}=H$ y $R^{15}=H$);

- sulfato de condroitina D que está sulfatado predominantemente en el carbono 2 del ácido glucurónico y en el carbono 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6condroitina ($R^{13}=SO_3H$, $R^{14}=H$ y $R^{15}=SO_3H$);

- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina ($R^{13}=SO_3H$, $R^{14}=SO_3H$ y $R^{15}=H$); y

en donde “e” representa el número de repeticiones del monómero, es decir, su grado de polimerización.

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

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

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

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

La goma gelano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica formada por unidades de α -L-ramnosio, β -D-ácido glucurónico y dos unidades de β -D-glucosa. El polímero puede encontrarse en forma parcialmente acetilada. Dependiendo de su grado de acetilación, la goma gelano proporciona

geles con propiedades mecánicas distintas. En el contexto de la presente invención, el término “goma gelano” incluye todos sus diferentes derivados, así como combinaciones de los mismos. Sin querer estar limitado por la teoría, pensamos que las nanopartículas de la invención son estructuras sólidas homogéneas en las que los miRNAs son adsorbidos. Esto es contrario a los sistemas utilizados para transportar miRNAs que se han venido utilizando hasta ahora. Como ya se ha mencionado arriba, los que se están utilizando ahora para la realización de ensayos clínicos de miRNAs utilizan liposomas o vesículas, es decir, estructuras de bicapa lipídica que encierran en su interior una fase acuosa. Los miRNAs quedan unidos a la estructura sólida que forman los ésteres de sorbitol y la sustancia cargada positivamente.

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

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

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

Aplicaciones y miRNAs

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

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

Por otro lado, se han identificado las proteínas ARHGAP1 y E2F1 como dianas del miR-20a, y constituye pues otro aspecto de la invención el uso de las nanopartículas de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por ARHGAP1 y/o E2F1. La sobreexpresión de E2F1 está realcionada con glioblastoma, cáncer de páncreas melanoma y cáncer de testículos y la de ARHGAP con el cánc de mama. Por tanto, las partículas de la invención también son útiles para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición que se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de testículos y cáncer de mama.

El término “tratamiento” o “tratar” en el presente documento significa administrar las nanopartículas de la invención para prevenir, reducir o eliminar uno o más de los síntomas o causas o efectos (metástasis) de una enfermedad o condición. También abarca la prevención, reducción o eliminación de las secuelas de dicha enfermedad o condición, o de los efectos secundarios o adversos provocados por otra medicación utilizada. También abarca la administración para mantener la salud en sujetos en riesgo de padecer dicha enfermedad. El término “reducir” se entiende como cualquier mejora en la situación del paciente, bien

medido por parámetros subjetivos (por ejemplo, percepción del paciente) u objetivos (medición de parámetros fisiológicos, bioquímicos, histopatológicos, microbiológicos-analíticos).

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

Otro aspecto de la invención es un método para el tratamiento de un individuo en necesidad de tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de nanopartículas de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de principio activo calculada para producir el efecto deseado y estará determinada generalmente, entre otros motivos, por las propias características del principio activo utilizado y el efecto terapéutico que va a obtenerse. En una realización particular, la dosis de principio activo administrada a un sujeto para el tratamiento o la profilaxis de los estados mencionados anteriormente está en el intervalo de 10^{-10} a 10^{10} mg/kg de peso corporal, normalmente entre 10^{-3} y 10^3 mg/kg o entre 10^{-2} y 50 mg/Kg de peso corporal.

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

El término "excipiente" se refiere a un diluyente, adyuvante, o vehículo con el que se administran las nanopartículas de la invención. Son sustancias que, por ejemplo, se añaden a

los principios activos o a sus asociaciones para servirles de vehículo, posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físicoquímicas del medicamento y su biodisponibilidad. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente agua o soluciones salinas de disolución acuosa y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, o de glucosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

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

Procedimiento de preparación

Otra de las ventajas de la presente invención es la facilidad con la que se preparan las nanopartículas, procedimiento que no requiere inyección u homogeneización. En términos generales el procedimiento comprende (i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán sobre una solución acuosa; (ii) la etapa de evaporar el disolvente, es decir, el disolvente orgánico, y el agua; y (iii) una etapa opcional de incubación. La sustancia cargada positivamente puede incorporarse a la solución orgánica o a la solución acuosa. Por otro lado, el miRNA (o los miRNAs) se incorpora(n), bien durante la etapa (i) como parte de la solución acuosa, bien en la etapa de incubación (iii), o bien en ambas etapas (i) y (iii). En caso de que no se incorpore ningún miRNA durante la etapa (i), es necesario proceder a la incubación (etapa (iii)) para incorporar el miRNAs (o los miRNAs). Así, una alternativa es un procedimiento que comprende (i) la etapa de añadir una solución que comprende un disolvente orgánico, un éster de sorbitán y una sustancia cargada positivamente sobre una solución acuosa que comprende un miRNA; y (ii) la etapa de evaporar el disolvente, es decir, el disolvente orgánico, y el agua. Otra alternativa comprende (i) la etapa de añadir una solución que comprende un disolvente orgánico, un éster de sorbitán y una sustancia cargada positivamente sobre una solución acuosa; (ii) la etapa de evaporar el disolvente, es decir, el disolvente orgánico, y el agua; y (iii) la etapa de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de un miRNA. Procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en WO2013/068625.

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

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

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

Alternativamente, es posible obtener nanopartículas pegiladas o modificadas con derivados de óxido de etileno. Estas nanopartículas pegiladas o modificadas con derivados de óxido de

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

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

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

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

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

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

Los componentes descritos arriba se pueden combinar para que en cada caso la nanopartícula de la invención que resulta se adapte a la situación concreta, y la presente invención abarca distintas combinaciones de ésteres de sorbitán, sustancias cargadas positivamente, miRNAs, así como sustancias cargadas negativamente y otros componentes opcionales en caso de ser

5 usados. Por ejemplo, una realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs (por ejemplo, miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de los mismos); (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula $(R^{10})_p (R^{11})(R^{12})NR^9$, tal y como se ha descrito más arriba; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. En otra realización, la presente

10 invención comprende (i) uno o más miRNAs (por ejemplo, miR-20a, miR-29, miR-652 o mezclas de los mismos, o también miR-93 o mezclas de este con uno o más de los anteriores); (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente que se selecciona del grupo que consiste en CTAB, BZC, oleilamina y mezclas de las mismas; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. Otra realización de la

15 presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs; (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula $(R^{10})_p (R^{11})(R^{12})NR^9$, tal y como se ha descrito más arriba; y (iv) un polisacárido cargado negativamente en donde al menos uno de sus monómeros comprende un grupo $-COOH$ o $-SO_3H$.

20 Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que comprende (i) uno o más miRNAs; (ii) un éster de sorbitán; (iii) una sustancia cargada positivamente; y (iv) un polisacárido cargado positivamente en donde al menos uno de sus monómeros comprende un grupo $-COOH$ o $-SO_3H$. Otra realización de la presente invención es una nanopartícula que

25 comprende (i) uno o más miRNAs; (ii) un éster de sorbitán de fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente; (iii) una sustancia cargada positivamente de fórmula $(R^{10})_p (R^{11})(R^{12})NR^9$, tal y como se ha descrito más arriba; y (iv) un polisacárido cargado negativamente. Las anteriores combinaciones y otras que no se describen explícitamente forman también parte del ámbito de protección.

Hay que tener en cuenta que, además del miRNA, las nanopartículas de la invención pueden 30 comprender otros componentes como, por ejemplo, otros principios activos de interés, para lo cual bastaría con añadirlos, a la solución orgánica o a la solución acuosa o a ambas durante la

preparación de la nanopartícula. También sería posible añadirlas durante la etapa adicional (iii) de incubación.

EJEMPLOS

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

El tamaño de las nanopartículas se determinó mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y usando un Zeta Sizer (Zeta Sizer, Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments, R.U.), obteniendo el tamaño medio de la población y el índice de polidispersión
10 del mismo. El procedimiento comprende diluir las muestras en agua Milli-Q a una proporción 1:19. Cada análisis se llevó a cabo a 25°C con un ángulo de detección de 173°.

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

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

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

Para confirmar la validez de las nanopartículas de la invención en una prueba de concepto se realizaron los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se describen a continuación. Con estos ensayos se buscaba, entre otros, confirmar la correcta asociación de los miRNAs en las nanopartículas, su
30 correcta distribución a las células diana relevantes, y su efecto terapéutico mejorado

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

Preparación y caracterización de nanopartículas

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

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

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

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

Eficiencia de la asociación entre el miRNA y la nanopartícula

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

Manejo de animales:

Todos los experimentos descritos en este trabajo se han llevado a cabo de acuerdo con las leyes españolas y europeas relativas al cuidado de animales para experimentación. La manipulación de animales y los métodos experimentales de nuestro laboratorio se han analizado y aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco, España. Se llevaron a cabo todos los esfuerzos para minimizar el número de animales empleados y su sufrimiento. Se obtuvieron ratones C57 BL/6NCrl (hembras, 8 semanas de edad) a través de Charles River Laboratories España, S.A. Se alojó a los ratones en la Unidad de Recursos Biológicos de la Universidad del País Vasco y se los mantuvo en un ambiente de

temperatura controlada (21 ± 1 °C), humedad relativa del $55 \pm 5\%$, ciclo de luz/oscuridad de 08h00-20h00 y se les suministró alimento para ratón convencional y agua *ad libitum*.

Modelo de metástasis hepática y evaluación clínica: Se desarrolló un modelo de metástasis

hepática inyectando en los ratones una línea celular de cáncer colorrectal murino c26 (200.000

5 células/animal). Se anestesió a los animales con isoflurano (5% y 1,5% de mantenimiento) y

se inyectaron las células en el bazo. Después de la intervención se suturaron las incisiones. Se

trató a los animales en el día 3 después de la inoculación del tumor y posteriormente cada 3

días hasta el día 21 con una dosis total de 25 µg de miRNA por animal. Los ratones se

separaron en 5 grupos diferentes dependiendo del tratamiento. El grupo 1 se trató con

10 placebo (glucosa); el grupo 2, según la invención, se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS

asociadas con miR-20a con un marcador fluorescente (6-carboxifluoresceína) (FAM); el grupo 3

se trató con miR-20a libre o desnudo (sin ningún vehículo específico); el grupo 4 se trató con

nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con un miRControl (este miR no ataca a ningún

mRNA); el grupo 5 se trató con las nanopartículas SP80-OA-CS en blanco (sin mRNA asociado).

15 En el día 21 después de la inoculación se sacrificó a los animales y se observaron los hígados y

se procesaron posteriormente para análisis histológico.

Histología:

Después de la dislocación cervical se extirparon rápidamente los hígados y se fijaron en

paraformaldehído (PFA al 4%) en PBS, durante toda la noche a 4°C. Los hígados fijados se

20 procesaron para su inclusión en parafina. Se montaron secciones seriadas de 10 µm de grosor

en cinco series paralelas y se procesaron para hematoxilina-eosina. Se capturaron imágenes

microscópicas en un microscopio Zeiss.

Algunas secciones de hígado se observaron 48 horas después de la última inyección. Las

secciones se incubaron con marcador de receptor anti-manosa y anticuerpo Alexa 593 anti-

25 ratón. El marcador verde del miR-20a (FAM) se observó dentro de las células endoteliales

marcadas en rojo, lo que confirma el ataque endotelial o la distribución específica a las células

endoteliales del sinusoide hepático ("LSEC" de acuerdo con sus siglas en inglés) que

proporcionan las nanopartículas al miR-20a.

Después de la evaluación macroscópica de los hígados, se confirmó el efecto terapéutico en

30 términos de regulación clínica de las metástasis hepáticas en el grupo de animales tratados

con SP80-OA-CS asociadas con miR-20a (Figura 2).

Las secciones de los hígados de la Figura 2 se tiñeron con hematoxilina-eosina y se cuantificó el

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

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

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

Células de Cáncer Colorectal

Se utilizaron líneas celulares de cáncer colorectal murino c26 (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) singénicas con ratones Balb/c. Las células se cultivaron en condiciones standard en medio RPMI (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), complementado con 10% suero bovino fetal (FBS), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) and amfotericina B (0.25 µg/ml), todos adquiridos de Life technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.)

Células de control y activadas por tumor

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

purificación de ARN siguiendo el protocolo de un minikit Purelink RNA (Gibco Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.).

Preparación y caracterización de SP-OA-CS de control, SP-OA-CS asociada con pEGFP y SP-OA-CS asociada con miRNA

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

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

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

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

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

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

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

Para verificar si la anulación de miR-20a en el LSEC de hígados colonizados por tumores tuvo alguna consecuencia en el comportamiento fisiológico de estas células, se cultivaron en insertos de poro de 8 μ m recubiertos con colágeno para medir su capacidad de migración. Las

LSEC activadas por tumores se trataron con miR-20a, con control de miR o con el vehículo de transfección sin carga Myrus®. Se descubrió que la capacidad de migración LSEC aumentó aproximadamente dos veces cuando las células se activaron mediante el tumor, pero esto se invirtió casi a niveles basales cuando las células se transfectaron con miR-20a exógeno (p<0,05). Por lo tanto, la restauración de la expresión de miR-20a celular en LSECs fue suficiente para evitar el aumento de capacidad migratoria asociado con activación inducida por tumor (Figura 6).

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

Siguiendo una metodología análoga a la del ejemplo 1, se anestesiaron ratones Balb/c con isoflurano (Esteve, España), y se realizó un pequeño corte en su lado izquierdo. A continuación, el bazo se expuso para realizar una inoculación intra-esplénica de 50 µl de células de carcinoma de colon C26 a una concentración de 2×10^6 células/ml para cada ratón. Los animales se dividieron en 5 grupos, y los tratamientos se realizaron cada 3 días desde el día de la inoculación de células cancerosas. El grupo 1 se trató con placebo (glucosa); el grupo 2, según la invención, se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con miR-20a; el grupo 3 se trató con miR-20a libre o desnudo (sin ningún vehículo específico); el grupo 4 se trató con nanopartículas de SP80-OA-CS asociadas con un miRControl (este miR no ataca a ningún mRNA); el grupo 5 se trató con las nanopartículas SP80-OA-CS en blanco (sin mRNA asociado). Finalmente, los hígados se incluyeron en parafina y se congelaron para análisis histológicos. Para cuantificar el área tumoral ocupada, se cortaron secciones de 7 µm consecutivas con 500 µm entre ellas en hígados incluidos en parafina. A continuación, se realizó tinción con hematoxilina y eosina, y el área tumoral se cuantificó usando Software ImageJ. Además, para analizar las LSEC infiltradoras potencialmente activadas en el área metastatizada, se realizó inmunotinción con dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal anti-CD31 (BD Pharmingen, EE.UU.), seguido del anticuerpo fluorescente secundario Alexa 594 (1:1000) apropiado. Se cuantificaron las imágenes usando el programa AnalySIS V3.2 (Olympus Software Imagine Solutions GMBH, Munster, Alemania). Los resultados se expresan como un porcentaje de área tisular coloreada específicamente con respecto al área analizada completa. Los resultados se muestran en la Figura 7.

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

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

Se realizó a continuación un análisis de transferencia de Western con LSEC activadas por tumores y LSEC activadas por tumores cultivadas con miR20a exógeno. Brevemente, se lisaron cultivos de LSEC con tampón de RIPA, se separaron a través de electroforesis de SDS-PAGE 8 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se detectaron E2F1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE.UU.) y ARHGAP1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (1:1000) usando proteína A conjugada con peroxidasa de rábano rústico (1:5.000) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). Las bandas se visualizaron usando un kit de Sustrato Femto Super Signal (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, EE.UU.). Se usó GAPDH como un control de carga de proteínas.

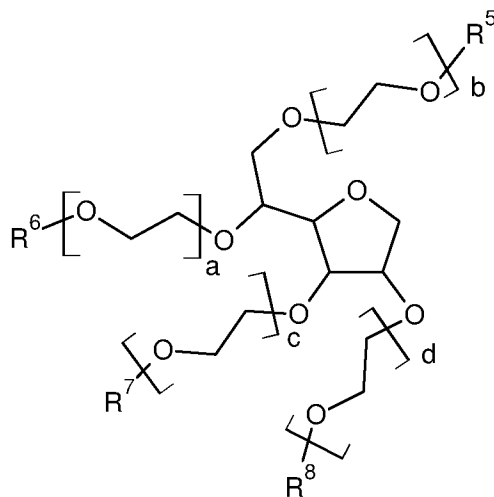
En condiciones de control, E2F1 y ARHGAP1 mostraron baja expresión. Sin embargo, después de la activación de LSEC con el tumor, tanto E2F1 como ARHGAP1 se regularon en gran medida positivamente. Cuando las células se transfectaron *in vitro* con miR-20a, la expresión de proteínas se redujo en ambos casos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

Ejemplo 6: Liofilización

Las nanopartículas desarrolladas en el ejemplo 1 se evaluaron con éxito respecto de su capacidad para mantener la asociación al miRNA después de un proceso de liofilización.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende (i) entre un 60% y un 99% en peso, con respecto al peso total de la nanopartícula, de un éster de sorbitán; (ii) una sustancia cargada positivamente; y (iii) un miRNA.
2. La nanopartícula según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sustancia cargada positivamente comprende un grupo amonio o amina unido a uno, dos o tres restos que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, alquinilo C₂-C₄₀.
3. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha sustancia cargada positivamente tiene la fórmula $(R^{10})_p (R^{11})(R^{12})NR^9$, en donde cada uno de R¹⁰, R¹¹ y R¹² se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄, alquinilo C₂-C₄, y fenilalquilo C₇-C₁₅;
R⁹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄₀, alquenilo C₂-C₄₀, alquinilo C₂-C₄₀;
p es 0 o 1;
y en donde también comprende un contranión en el caso en el que p es 1.
4. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha sustancia cargada positivamente se selecciona del grupo que consiste en oleilamina, cloruro de benzalconio y bromuro de cetil trimetil amonio.
5. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho éster de sorbitán comprende un compuesto de fórmula I



Fórmula I

en donde

5 cada uno de R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, $-(C=O)$ -alquilo C_1-C_{40} , $-(C=O)$ -alquenilo C_2-C_{40} , $-(C=O)$ -alquinilo C_2-C_{40} , con la condición de que al menos uno de R^5 , R^6 , R^7 y R^8 no es $-H$;

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

6. La nanopartícula según la reivindicación 5, caracterizada por que dicho grupo alquilo es lineal y comprende entre 2 y 20 átomos de carbono.

10 7. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizada por que dicho grupo alquilo tiene 9, 11, 13, 15 o 17 átomos de carbono.

8. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 ó 7, caracterizada por que dicho grupo alquenilo es lineal y comprende entre 4 y 25 átomos de carbono.

15 9. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 7 u 8, caracterizada por que dicho grupo alquenilo tiene la fórmula $-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10.

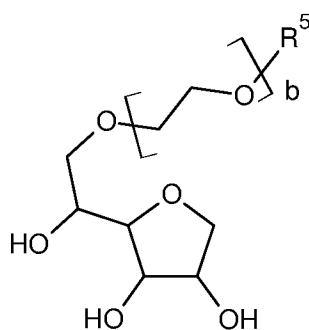
10. La nanopartícula según la reivindicación 9, caracterizada por que n es 7 y m es 7.

11. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, caracterizada por que a, b, c y d son 0.

12. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, caracterizada por que la suma de a, b, c y d se encuentra entre 10 y 30.

5 13. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, caracterizada por que R^6 , R^7 y R^8 son -H.

14. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que dicho éster de sorbitán tiene la fórmula II



Fórmula II

en donde

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

b es un número entre 0 y 100.

15 15. La nanopartícula según la reivindicación 14, caracterizada por que b es 0; y R^5 tiene la fórmula $-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$, en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10, y m es un número entero comprendido entre 1 y 10.

16. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que tiene un potencial positivo comprendido entre +1 y +100 mV.

17. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada por que comprende una sustancia cargada negativamente.

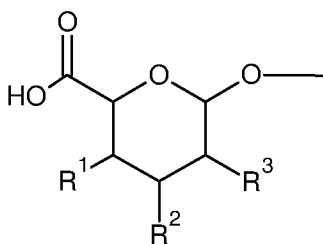
18. La nanopartícula según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente comprende un polisacárido cuya unidad repetitiva tiene la fórmula $[X-Y-(Z)_n]$ en donde n es 0 o 1; X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; con la condición de que al menos uno de X, Y y Z comprende un azúcar ácido y en donde los grupos X, Y y Z se unen entre sí a través de enlaces $-O$ -glucosídicos.

19. La nanopartícula según la reivindicación 18, caracterizada por que dicho azúcar ácido se selecciona del grupo formado por los ácidos aldónicos, ácidos ulosónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos y mezclas de los mismos.

20. La nanopartícula según la reivindicación 18, caracterizada por que Y comprende un azúcar ácido.

21. La nanopartícula según la reivindicación 20, caracterizada por que Y comprende un ácido urónico.

22. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 21, caracterizada por que dicho ácido urónico tiene la fórmula III



Fórmula III

en donde

cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, $-OH$, $-O-$, $-OR^4$, $N(H)-R^4$ y $-O-SO_3$, con la condición de que al menos uno de R^1 , R^2 y R^3 sea $-O-$,

en donde -O- es el átomo de oxígeno que forma el enlace glucosídico, y

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

23. La nanopartícula según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha sustancia cargada
5 negativamente es un polisacárido que comprende uno o más grupos carboxílicos.

24. La nanopartícula según la reivindicación 23, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente comprende ácido glucurónico en su estructura repetitiva.

25. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, caracterizada por que dicha sustancia cargada negativamente se selecciona del grupo que consiste en ácido
10 hialurónico, sulfato de condroitina y goma xantana.

26. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, caracterizada por que tiene un potencial negativo comprendido entre -25 y -40 mV.

27. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho miRNA se selecciona del grupo que consiste en miR-20a, miR-29, miR-652 miR-34a, miR-
15 16 y mezclas de los mismos.

28. La nanopartícula según la reivindicación 27, caracterizada por que dicho miRNA es miR-20a.

29. Una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 30. Uso de la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, para la fabricación de un medicamento.

31. Uso de la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una indicación que se selecciona del grupo que consiste en cáncer, diabetes, enfermedades
25 neurodegenerativas, enfermedades del sistema respiratorio, alteraciones metabólicas y enfermedades vasculares.

32. Uso según la reivindicación 31 para el tratamiento del cáncer.
33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32 para el tratamiento del cáncer colorectal.
34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31, 32 ó 33 para el tratamiento de la metástasis en hígado.
35. Un procedimiento para la preparación de la nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, caracterizado por que comprende (i) la etapa de añadir una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico y un éster de sorbitán sobre una solución acuosa; en donde dicha solución orgánica o dicha solución acuosa o ambas comprenden una sustancia cargada positivamente; (ii) la etapa de evaporar disolvente orgánico y agua; y (iii) la etapa opcional de incubar la nanopartícula resultante de la etapa (ii) en presencia de otras sustancias; en donde un miRNA se incorpora (a) durante la etapa (i) como parte de la solución acuosa, (b) en la etapa de incubación (iii), o en ambas etapas (i) y (ii).
36. El procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por que dicha solución acuosa comprende una sustancia cargada negativamente.
37. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 ó 36, caracterizado por que dicho disolvente orgánico es total o parcialmente soluble en agua.
38. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35, 36 ó 37, caracterizado por que dicho disolvente es un alcohol.

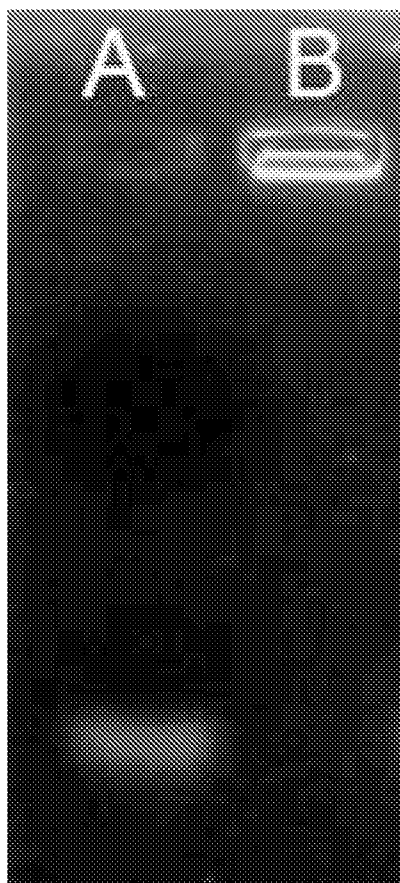


Figura 1

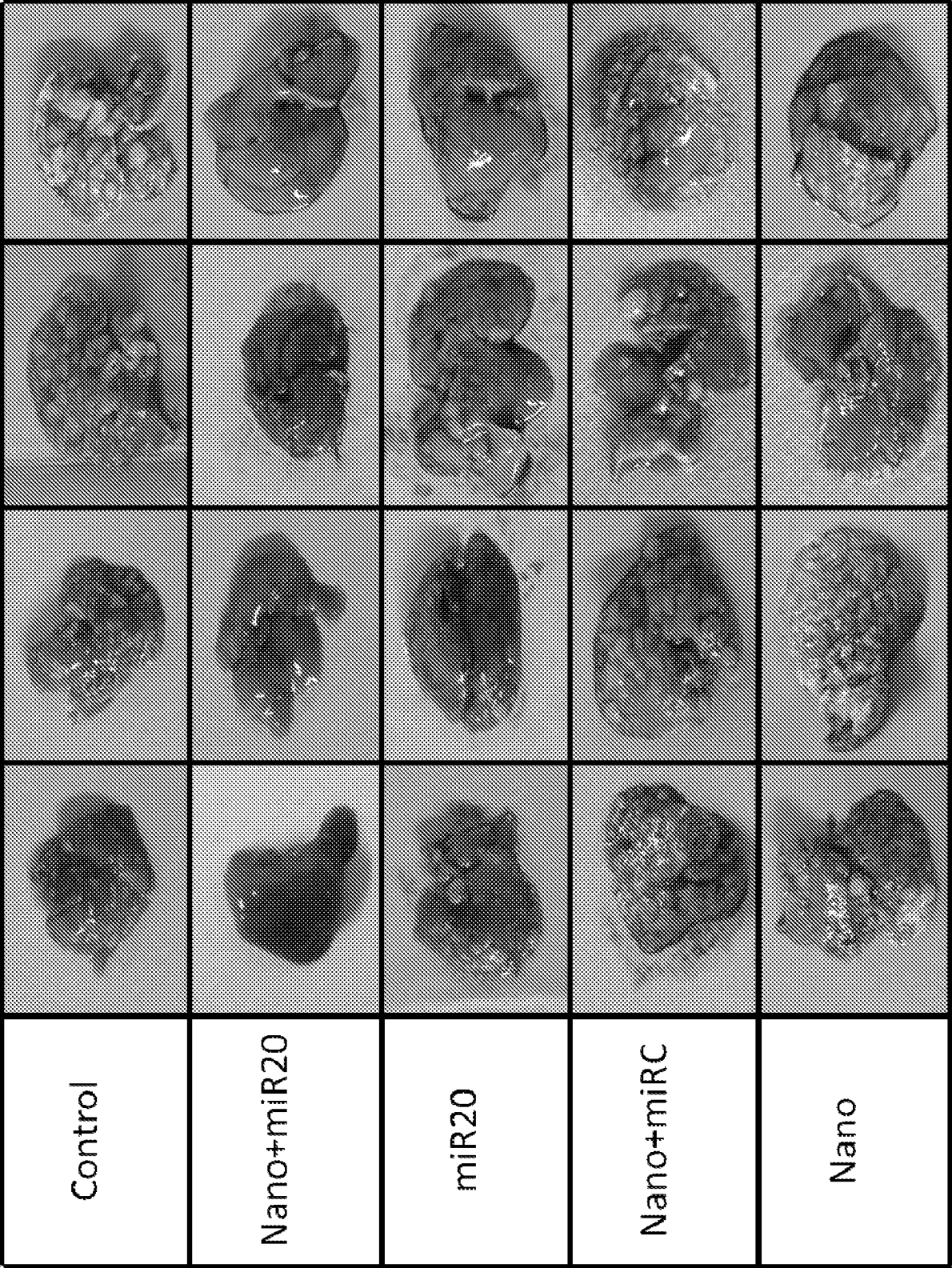


Figura 2

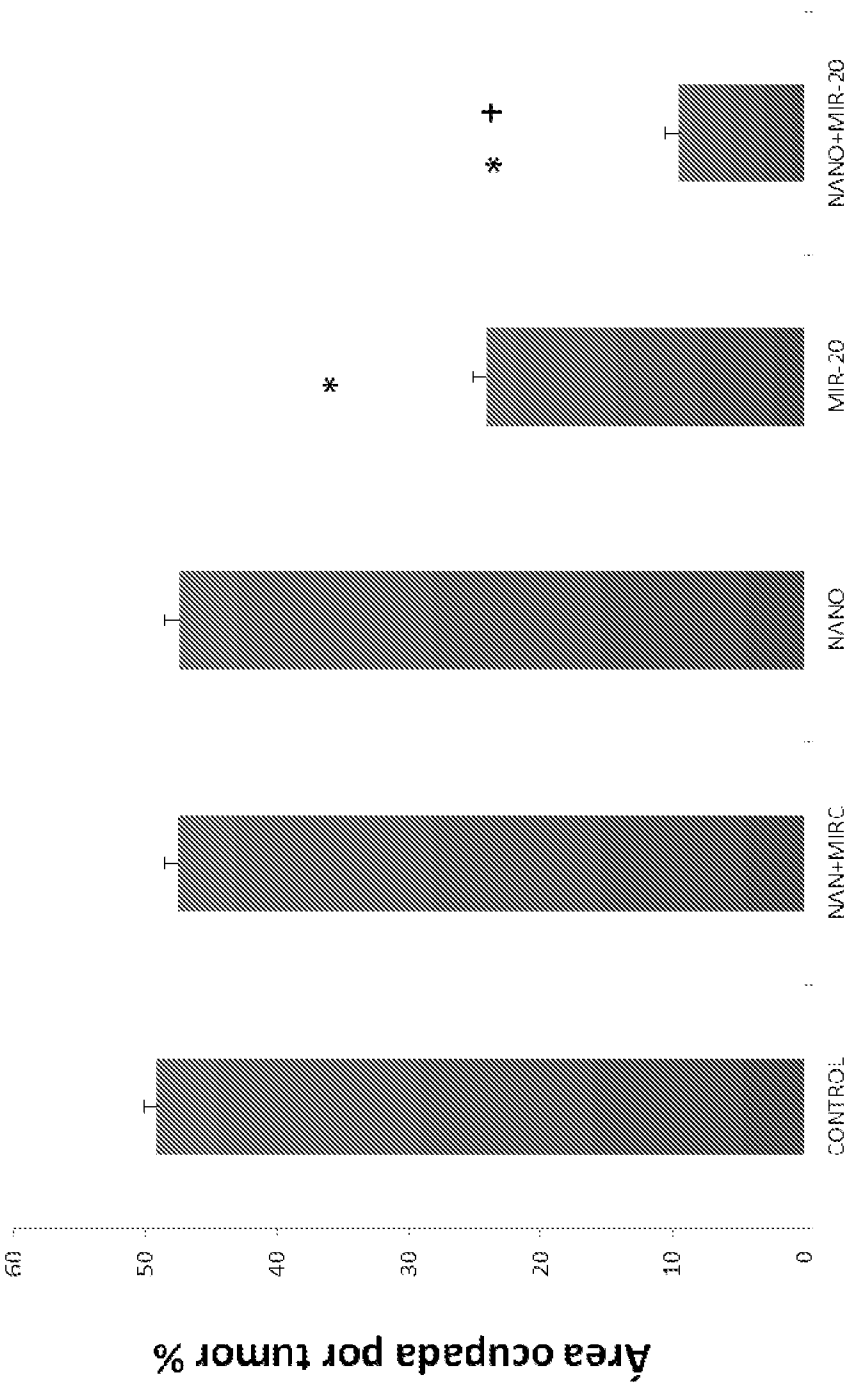


Figura 3

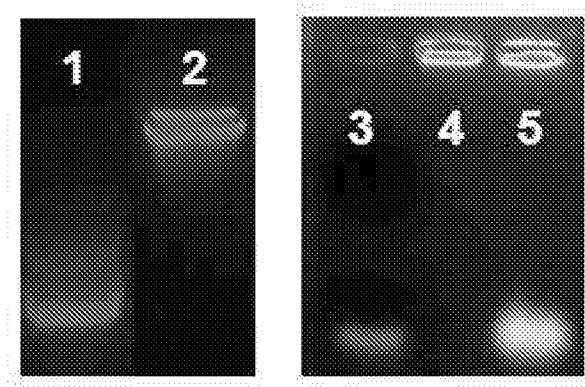


Figura 4

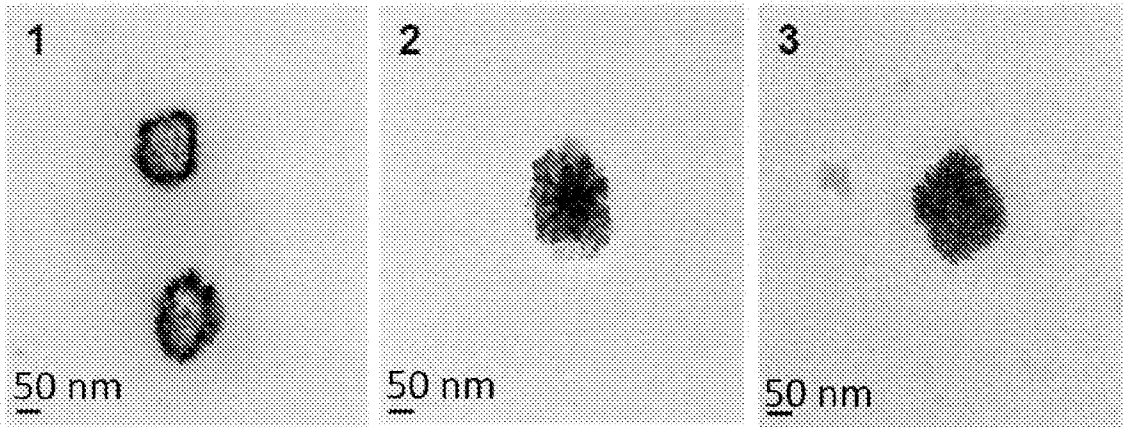


Figura 5

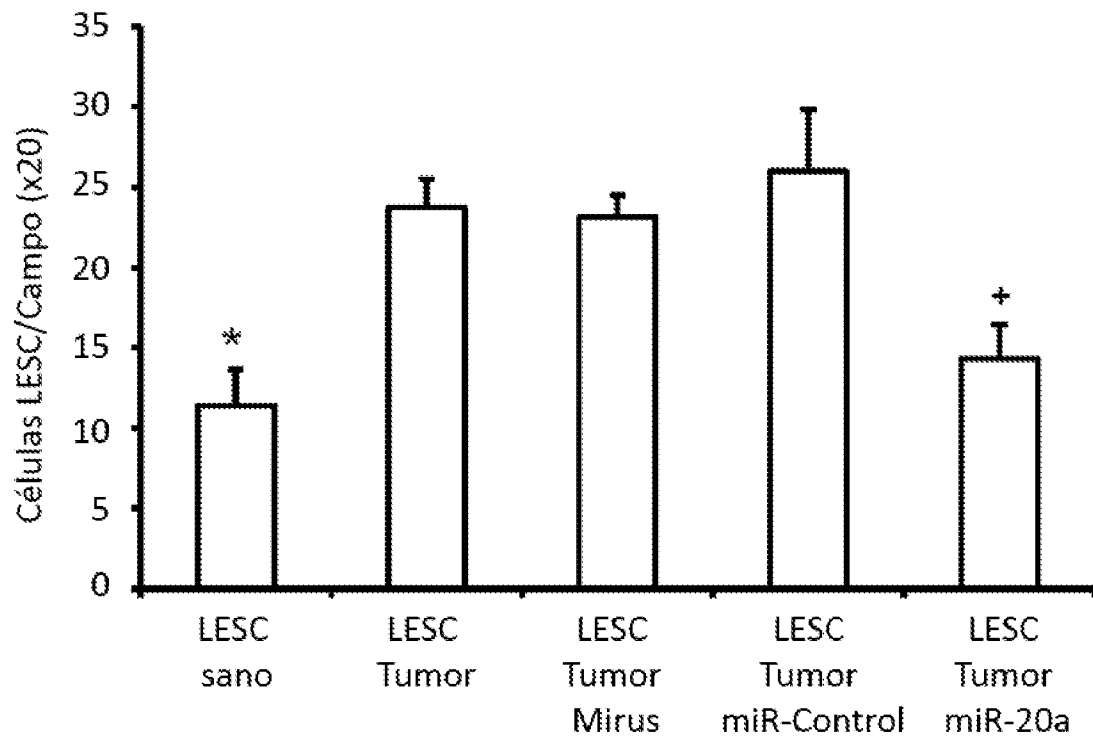


Figura 6

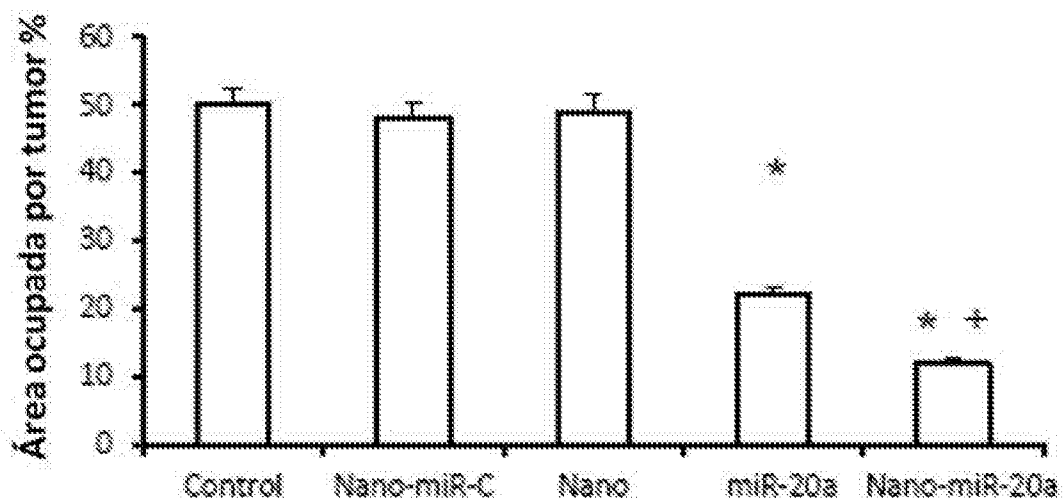


Figura 7

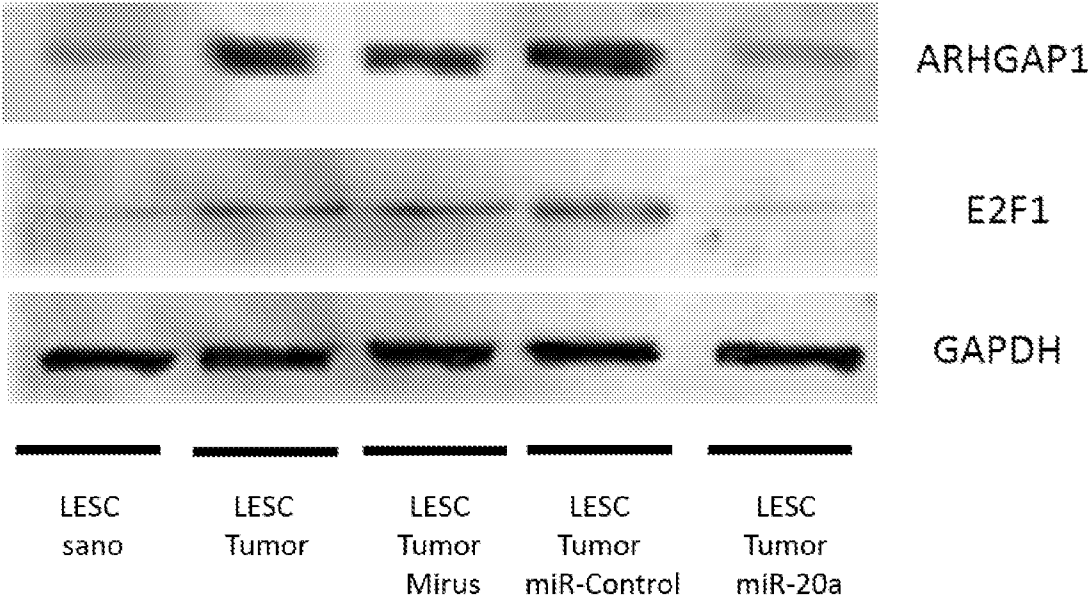


Figura 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, B82B, B82Y, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/068625 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 16.05.2013, page 1, lines 4-7; page 6, lines 12-13; page 9, lines 25-29; page 10, lines 7-8; page 11, lines 14-16; page 12, lines 4-30; page 13, line 5- page 14, line 25; page 16, lines 21-22; page 20, lines 22-23; page 22, lines 3-13; page 25, line 15 page 26, line 7; page 26, lines 22-34; page 27, lines 6-15; page 35, example 5; page a 46, example 14.	1-26,29-31,35-38
A	ANDRÉ, E.M. et al. "Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease". Biomaterials 2016, Volume 83, pages 347-362. [Available on line 06.01.2016]. See page 347, abstract; pages 355-365, parts 2.2.2 and 2.3.	1-38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28/06/2017

Date of mailing of the international search report
(29/06/2017)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
G. Esteban García

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495425

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070205

C (continuation).			DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.	
A	LAM, J. KW. et al. "siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing". Molecular Therapy-Nucleic Acids 2015, Volume 4, e252. [Available on line 15.09.2015]. See page 1, abstract; page 11, column 1, paragraph 2-page 13, column 1-paragraph 1; tables 4 and 5.			1-38	
A	SHI, S. et al. "Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression". Journal of Controlled Release 2014, Volume 194, pages 228-237. [Available on line 16.09.2014]. See page 228, abstract.			1-38	
A	SILVA, A.C. et al. "Lipid Nanoparticles for the Delivery of Biopharmaceuticals". Current Pharmaceutical Biotechnology 2015, Volume 16, Number 4, pages 291-302 (12). [Available on line 01.04.2015]. See page 1, abstract; part 2.2.2.			1-38	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2017/070205

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2013068625 A1	16.05.2013	US2014314852 A1	23.10.2014
		ES2403544 A1	20.05.2013
		ES2403544 B2	13.12.2013
		EP2792350 A1	22.10.2014
		EP2792350 A4	22.04.2015
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070205

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7105 (2006.01)

B82B1/00 (2006.01)

B82B3/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P35/04 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

A61P11/00 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070205

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, B82B, B82Y, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, WPI, TXTE, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, GOOGLESCHOLAR, PUBMED

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2013/068625 A1 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 16.05.2013, página 1, líneas 4-7; página 6, líneas 12-13; página 9, líneas 25-29; página 10, líneas 7-8; página 11, líneas 14-16; página 12, líneas 4-30; página 13, líneas 5-página 14, línea 25; página 16, líneas 21-22; página 20, líneas 22-23; página 22, líneas 3-13; página 25, línea 15-página 26, línea 7; página 26, líneas 22-34; página 27, líneas 6-15; página 35, ejemplo 5; página 46, ejemplo 14.	1-26,29-31,35-38
A	ANDRÉ, E.M. et al. "Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease". Biomaterials 2016, Volumen 83, páginas 347-362. [Disponible en línea el 06.01.2016]. Ver página 347, resumen; páginas 355-365, apartados 2.2.2 y 2.3.	1-38

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
28/06/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29 de junio de 2017 (29/06/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
G. Esteban García
Nº de teléfono 91 3495425

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2017/070205

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	LAM, J. KW. et al. “siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing”. Molecular Therapy-Nucleic Acids 2015, Volumen 4, e252. [Disponible en línea el 15.09.2015]. Ver página 1, resumen; página 11, columna 1, párrafo 2-página 13, columna 1-párrafo 1; tablas 4 y 5.	1-38
A	SHI, S. et al. “Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression”. Journal of Controlled Release 2014, Volumen 194, páginas 228-237. [Disponible en línea el 16.09.2014]. Ver página 228, resumen.	1-38
A	SILVA, A.C. et al. “Lipid Nanoparticles for the Delivery of Biopharmaceuticals”. Current Pharmaceutical Biotechnology 2015, Volumen 16, Número 4, páginas 291-302 (12). [Disponible en línea el 01.04.2015]. Ver página 1, resumen; apartado 2.2.2.	1-38

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070205

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2013/068625 A1	16.05.2013	US2014314852 A1	23.10.2014
		ES2403544 A1	20.05.2013
		ES2403544 B2	13.12.2013
		EP2792350 A1	22.10.2014
		EP2792350 A4	22.04.2015
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K31/7105 (2006.01)

B82B1/00 (2006.01)

B82B3/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P35/04 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

A61P11/00 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)