

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 426 939**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2006 E 06290795 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1723958**

(54) Título: **Vectorización de ARN bicatenario por partículas catiónicas y su utilización tópica**

(30) Prioridad:

19.05.2005 FR 0551301

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

25.10.2013

(73) Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)

14, RUE ROYALE

75008 PARIS, FR

(72) Inventor/es:

**COLLIN-DJANGONE, CHRISTINE y
SIMONNET, JEAN-THIERRY**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 426 939 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectorización de ARN bicatenario por partículas catiónicas y su utilización tópica

La presente invención se refiere a la vectorización de dsARN por partículas catiónicas seleccionadas entre micelas de tensioactivos y micelas de polímeros bloques, así como a unas composiciones tópicas para la piel, las mucosas y los ojos que comprende la asociación de al menos un dsARN y de al menos una partícula catiónica.

Se busca la utilización de sustancias que presentan una actividad específica, tal como una actividad biológica específica, en el campo cosmético tal como el cuidado de la piel o el cuidado capilar, pero también en los campos dermatológicos y farmacéuticos.

Desde hace poco tiempo, la utilización de dsARN y más particularmente de siARN (de 12 a 40 nucleótidos) permite obtener una actividad de inhibición específica de la síntesis de una proteína diana.

El mecanismo molecular utilizado hace intervenir unos fragmentos de ARN bicatenario constituidos por 12 a 40 nucleótidos. La degradación del ARNm diana se obtiene mediante la activación del complejo RISC (RNA Induced Silencing Complex) efectiva por la fijación de la hebra antisentido de dsARN sobre el ARNm. Estos oligonucleótidos de ARN bicatenario, se denominan también dsARN o también siARN (por "short interfering" RNA), véase Tuschl T. *Chem. Biochem.* 2001; 2: 239-245, Nykanen A *et al.* *Cell* 2001 107 309-321, Dorsett Y. *Nature*, abril de 2004, Vol. 3, páginas 318-329 y Downward J. *BMJ* 2004, 328, 1245-1248.

Sin embargo, el problema de la penetración durante la aplicación tópica de estos siARN, cuyo peso molecular puede ser de aproximadamente 15-17 kD, se plantea y pide ser optimizado. En efecto, para que la actividad específica relativa al siARN seleccionada sea efectiva, es necesario que ésta penetre en la célula diana (por ejemplo los queratinocitos o los melanocitos, etc.) hasta en su citoplasma. Ahora bien, el estrato córneo, sede de la función de barrera cutánea, es difícil de penetrar. Por lo tanto se necesita buscar una solución que permita la penetración de siARN en la piel.

De manera inesperada, la solicitante ha constatado que la asociación de siARN con partículas catiónicas permite mejorar muy significativamente su penetración en las células dianas de un tejido tal como la piel. Una vez penetrado, el siARN se vuelve activo por su fijación sobre el RISC. La penetración se puede evaluar con la ayuda de un marcador fluorescente fijado sobre el siARN y su actividad por la cuantificación del mensajero diana por PCR cuantitativa o por dosificación de la proteína correspondiente al mensajero diana. Las partículas catiónicas de la invención pueden ser unas micelas de tensioactivos o unas micelas de polímeros bloques. De manera general, el tamaño medio de las partículas de la invención debe ser menor que el micrómetro.

La solicitud WO 03/101376 describe unas composiciones cosméticas que comprenden al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario. En esta solicitud, el oligonucleótido está necesariamente complejado con un polímero catiónico, como por ejemplo la PEI o el quitosano, pudiendo este complejo oligonucleótido-polímero catiónico ser encapsulado a continuación en liposomas o niosomas y/o ser adsorbido en la superficie de partículas tales como los liposomas, niosomas, oleosomas, nanoesferas y nanocápsulas.

Así, en este documento, el dsARN está necesariamente complejado con un polímero catiónico antes de ser asociado a un tipo de partícula.

Además, las micelas de tensioactivos no están descritas como solución galénica efectiva para la vectorización de siARN.

En el artículo: *Intercellular adhesion molecule-1 suppression in skin by topical delivery of anti-sense oligonucleotides de Mehta et al. (J. Invest. Dermatol 115:805-812, 2000)*, los autores vehiculan ADN monocatenario en una emulsión que contiene 25% de tensioactivos (10% de estearato de glicerilo y 15% de estearato 40 EO). Además del hecho de que este artículo no describe los siARN, la solución galénica propuesta no es compatible con una buena tolerancia cutánea. En efecto, el 25% de los tensioactivos tendrán como efecto destruir la función de barrera de la piel, aumentando así su permeabilidad a los elementos exteriores y favoreciendo dramáticamente su deshidratación: resultados que no se buscan en los campos de aplicación considerados por la presente invención.

En la publicación: *lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cell uptake and delivery with plasmid DNA de Spagnou et al. (Biochemistry, 43:13348-56, 2004)*, los autores utilizan unos liposomas catiónicos tales como la lipofectamina 2000 o liposomas de DOPE "cationizados" con colesteriloxicarbonil3-7-diazanonano 1-9 diamina (CDAN). Por razones de inocuidad, la lipofectamina no se puede utilizar sobre la piel humana y se buscarán soluciones más fáciles de realizar y económicamente compatibles con la comercialización del producto.

Otras publicaciones (Yano Junichi *et al.* *Clinical Cancer Research*, 2004, Spagnou *et al.* *Biochemistry*, 2004, y Ma Zheng *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2004) han propuesto asociar unos siARN con vesículas catiónicas constituidas por lípidos de cadenas oleilos que comprenden unas insaturaciones que los hacen muy sensibles a la oxidación, y por fosfolípidos, estando estas vesículas destinadas a ser utilizadas inmediatamente después de la preparación ya que no son estables en el tiempo.

La solicitud de patente WO 2004/046354 describe la utilización de siARN para las disfunciones cutáneas y preferiblemente a nivel de la dermis. Las composiciones descritas tales como los PIT, las emulsiones W/O, O/W y W/O/W son todas no iónicas. No se tiene en cuenta en esta solicitud de patente el interés principal y esencial de utilizar tensioactivos catiónicos en partículas catiónicas para favorecer la penetración de los siARN en las estructuras cutáneas. Por otra parte, si los PIT pueden ser inferiores al μm , estos son necesariamente no iónicos, como se describe en la patente WO 96/28132.

5 El documento WO 03/106636 describe la asociación de un polinucleótido con un tensioactivo catiónico tal como el cloruro de cetil-tri-amonio para formar un complejo. Es necesario a continuación estabilizar este complejo mediante una etapa de incubación a una temperatura comprendida entre 35 y 50°C.

10 En un segundo tiempo, es posible deshidratar la mezcla para obtener un polvo que se diluirá después en un disolvente seleccionado, antes del uso (inyección). Es posible asimismo, una vez formado el complejo, estabilizarlo mediante la adición de un lípido anfílico que puede ser un tensioactivo no iónico. Esta asociación ternaria se deshidrata después para obtener un polvo que será diluido después en una disolución acuosa adaptada.

15 La solicitud WO 03/106636 no precisa que sea necesario situarse por encima de la CMC (Concentración Micelar Crítica) del tensioactivo para formar el complejo polinucleótido/tensioactivo catiónico, pudiendo el complejo formarse por debajo de la CMC. Una vez que este complejo está formado, es cuando se considera la adición de otro compuesto anfílico que podrá formar unas micelas. Así, se obtiene la integración de un complejo polinucleótido/tensioactivo catiónico en micelas de anfílicos.

Así, en este documento, no se habla de asociar unas partículas catiónicas a un polinucleótido.

20 Así, la presente solicitud describe en primer lugar una composición tópica u ocular que comprende al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario, caracterizada por que el oligonucleótido de ARN bicatenario está asociado a al menos una partícula catiónica de un tamaño menor o igual que 1 μm , de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV seleccionada entre las micelas de tensioactivos, en particular las micelas de tensioactivos anfílicos no iónicos y de tensioactivos catiónicos, las micelas de polímeros bloques, en particular las micelas de polímero bloque anfílico catiónico, las micelas de polímero bloque anfílico no iónico y de polímero bloque anfílico catiónico, y las micelas de polímero bloque anfílico no iónico y de tensioactivo catiónico.

25 Por composición tópica, se entiende una composición adaptada a la aplicación sobre la superficie del cuerpo, es decir la piel, los faneros, las mucosas y ojos

30 La presente invención se refiere a la asociación de partículas catiónicas con al menos un dsARN que se adherirá a la superficie de la partícula, sirviendo ésta de vehículo para hacerlo penetrar en las estructuras cutáneas y en las células dianas de la piel, de las mucosas o también de los ojos para aplicaciones cosméticas, dermatológicas y/o oftálmicas.

35 Las partículas catiónicas según la invención son unas partículas que tienen un tamaño menor o igual que 1 μm , preferiblemente menor o igual que 500 nm, aún más preferiblemente menor o igual que 300 nm, que se puede medir con, por ejemplo, un granulómetro láser de tipo BI90 plus de la compañía Brookhaven, y que tienen un potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV que se puede medir con un zetámetro de tipo DELSA 440 de la compañía Coultronics.

A continuación se hace una lista no exhaustiva de partículas catiónicas que se pueden utilizar según la invención.

Micelas de tensioactivos

40 Como recordatorio, las micelas son los agregados que forman espontáneamente las moléculas anfílicas cuando se solubilizan en agua o en aceite, más allá de una cierta concentración denominada crítica: la CMC.

Las micelas que se pueden utilizar en el ámbito de la invención están constituidas al menos por un tensioactivo catiónico. Este tensioactivo catiónico puede estar asociado a uno o a varios tensioactivos anfílicos no iónicos.

45 El experto en la materia seleccionará ventajosamente los tensioactivos no iónicos y catiónicos en el McCutcheons 1998 "emulsifiers and detergents" así como en las ediciones siguientes.

A título de ejemplos no limitativos, los tensioactivos catiónicos que se pueden utilizar en el ámbito de la invención están listados a continuación.

50 Sin que sea limitativo, los tensioactivos no iónicos utilizables son: los alquilos y polialquilos (C6 a C30, saturado o no, ramificado o no) éster o éter de POE, de glicerol y de poliglicerol, de sorbitano oxietilenado o no, de sacarosa, de glucosa oxietilenada o no, de maltosa, de POP-POE.

En caso de mezcla entre tensioactivos no iónicos y tensioactivos catiónicos, sus proporciones respectivas, en peso, estarán comprendidas entre 99/1 y 1/99.

La tasa de tensioactivos que forman las micelas dependerá de la CMC de éstos. Sin embargo, en el ámbito de la invención, la concentración en tensioactivos micelares estará comprendida entre el 0,1 y el 10% y preferiblemente entre el 0,2 y el 5% en peso con respecto al peso total de la composición.

Micelas de polímero bloque

5 Las micelas de polímeros bloques anfílicos se pueden preparar según el procedimiento descrito en el documento WO 04/035013.

10 Los copolímeros bloques útiles para la preparación de las micelas asociados a los dsARN según la invención son en particular unos polímeros bloques anfílicos, preferiblemente no iónicos, dibloques o tribloques, que pueden formar en contacto con el agua unas micelas. Son en particular de tipo dibloque (A-B) o tribloque (A-B-A), correspondiendo A a un bloque polimérico hidrófilo no iónico y B a un bloque polimérico hidrófobo. El peso molecular de los polímeros puede estar comprendido entre 1000 y 100.000, y la relación A/B puede estar comprendida entre 1/100 y 50/1.

El bloque polimérico hidrófilo no iónico se puede seleccionar entre el polioxido de etileno (POE) y la polivinilpirrolidona (PVP), el poliácido acrílico (PAA).

15 El bloque polimérico hidrófobo se puede seleccionar entre el poliestireno, el poli(terc-butilestireno), el poli(metilmetacrilato), el poli(etilacrilato), el poli(butilacrilato), el poli(butilmetacrilato), el poli(vinilacetato), las policaprolactonas, las policaprolactamas, los polidimetilsiloxanos, los polioxídos de alquíleno de C3-C6, el poli(ácido aspártico), el poli(ácido láctico), el poli(ácido glicólico), la polileucina, los polibutadienos, los polietilenos, los polipropilenos, los polibutilenos.

El copolímero bloque se selecciona preferiblemente entre los copolímeros bloques siguientes:

- 20
- polioxido de propileno/polioxido de etileno
 - poliestireno/polioxietileno
 - polimetilmetacrilato/polioxietileno
 - polibutilmetacrilato/polioxietileno
 - polioxibutileno/polioxietileno
 - 25
 - policaprolactona/polioxietileno
 - polietileno/polioxietileno
 - polioxietileno/polioxibutileno/polioxietileno.

En el ámbito de la invención, es necesario añadir a la composición micelar:

- 30
- un polímero bloque anfílico catiónico del cual uno de los bloques es catiónico y se puede seleccionar entre, a título de ejemplo:
 - polimetacrilato de trimetil-etyl-amonio
 - polimetacrilato de dimetil-amino-etilo cuaternizado
 - polimetil-vinil-imidazolio;
 - cloruro de polivinil-bencil-trimetilamonio.

35

siendo la asociación de un polímero bloque anfílico no iónico con un polímero bloque anfílico catiónico tal que la relación entre los dos estará comprendida entre 99/1 y 1/99;

y/o

- al menos un tensioactivo catiónico tal como se lista a continuación.

40

En este caso, la relación respectiva entre el polímero bloque anfílico no iónico y el tensioactivo catiónico estará comprendida entre 50/50 y 99/1.

En el ámbito de la invención, la concentración en polímeros bloques micelares asociados o no a un tensioactivo catiónico, estará comprendida entre el 0,1 y el 10% y, preferiblemente, entre el 0,2 y el 5% en peso con respecto al peso total de la composición.

45

En una variante de la invención, se pueden formar asimismo unas micelas constituidas por polímeros bloques anfílicos catiónicos tales como los descritos anteriormente.

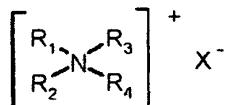
Tensioactivos catiónicos utilizables para la preparación de las partículas catiónicas de la invención

Se listan a continuación los tensioactivos catiónicos que se pueden utilizar según la invención, no siendo esta lista limitativa.

5 Los lípidos anfílicos catiónicos se seleccionan, preferiblemente, en el grupo formado por las sales de amonio cuaternario.

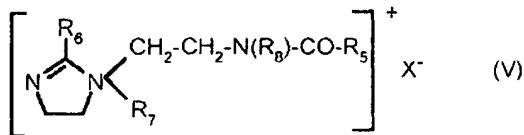
Las sales de amonio cuaternario son, por ejemplo:

- las que presentan la fórmula general (IV) siguiente:



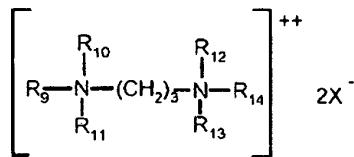
10 en la que los radicales R1 a R4, que pueden ser idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, que comprende de 1 a 30 átomos de carbono, o un radical aromático tal como arilo o alquilarilo. Los radicales alifáticos pueden comprender unos heteroátomos tales como en particular el oxígeno, el nitrógeno, el azufre, los halógenos. Los radicales alifáticos se seleccionan, por ejemplo, entre los radicales alquilo, alcoxi, polioxialquíleno (C2-C6), alquilamida, alquil (C12-C22) amido, alquilo (C2-C6), alquil (C12-C22) acetato, hidroxialquilo, que comprenden aproximadamente de 1 a 30 átomos de carbono; X es un anión 15 seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

- las sales de amonio cuaternario de imidazolinio, como por ejemplo el de fórmula (V) siguiente:



20 en la que R5 representa un radical alquenilo o alquilo que comprende de 8 a 30 átomos de carbono, por ejemplo derivados de los ácidos grasos de sebo, R6 representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo de C1-C4 o un radical alquenilo o alquilo que comprende de 8 a 30 átomos de carbono, R7 representa un radical alquilo de C1-C4, R8 representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo de C1-C4, X es un anión 25 seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquilsulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos. Preferiblemente, R5 y R6 designan una mezcla de radicales alquenilo o alquilo que comprenden de 12 a 21 átomos de carbono, por ejemplo derivados de los ácidos grasos de sebo, R7 designa metilo, R8 designa hidrógeno. Un producto de este tipo está comercializado por ejemplo bajo la denominación "REWOQUAT W 75" por la compañía REWO.

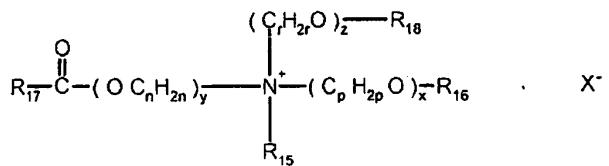
- las sales de diamonio cuaternario de fórmula (VI):



30 en la que R9 designa un radical alifático que comprende aproximadamente de 16 a 30 átomos de carbono, R10, R11, R12, R13 y R14, idénticos o diferentes, se seleccionan entre el hidrógeno o un radical alquilo que comprende de 1 a 4 átomos de carbono, y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, acetatos, fosfatos, nitratos y metilsulfatos. Dichas sales de diamonio cuaternario comprenden en particular el dicloruro de propanosebo diamonio;

- las sales de amonio cuaternario que contienen al menos una función éster.

Las sales de amonio cuaternario que contienen al menos una función éster utilizables según la invención son, por ejemplo, las de fórmula (VII) siguiente:



en la que:

- R15 se selecciona entre los radicales alquilo de C1-C6 y los radicales hidroxialquilos o dihidroxialquilos de C1-C6;

5

- R16 se selecciona entre:

- el radical



- los radicales R20 hidrocarbonados de C1-C22 lineales o ramificados, saturados o insaturados,
- el átomo de hidrógeno

10

- R18 se selecciona entre:

- el radical



- los radicales R22 hidrocarbonados de C1-C6 lineales o ramificados, saturados o insaturados,
- el átomo de hidrógeno,

15

- R17, R19 y R21, idénticos o diferentes, se seleccionan entre los radicales hidrocarbonados de C7-C21, lineales o ramificados, saturados o insaturados;

- n, p y r, idénticos o diferentes, son unos números enteros que tienen un valor de 2 a 6;

- y es un número entero que tiene un valor de 1 a 10;

- x y z, idénticos o diferentes, son unos números enteros que tienen un valor de 0 a 10;

20

- X⁻ es un anión simple o complejo, orgánico o inorgánico; con la condición de que la suma x + y + z valga de 1 a 15, que cuando x tiene el valor de 0, entonces R16 designe R20 y que cuando z tiene el valor de 0, entonces R18 designe R22.

Los radicales alquilo R15 pueden ser lineales o ramificados y más particularmente lineales.

25

Preferiblemente, R15 designa un radical metilo, etilo, hidroxietilo o dihidroxipropilo y más particularmente un radical metilo o etilo. Ventajosamente, la suma x + y + z tiene un valor de 1 a 10.

Cuando R16 es un radical R20 hidrocarbonado, puede ser largo y tener de 12 a 22 átomos de carbono, o corto y tener de 1 a 3 átomos de carbono.

Cuando R18 es un radical R22 hidrocarbonado, tiene preferiblemente de 1 a 3 átomos de carbono.

30

Ventajosamente, R17, R19 y R21, idénticos o diferentes, se seleccionan entre los radicales hidrocarbonados de C11-C21, lineales o ramificados, saturados o insaturados, y más particularmente entre los radicales alquilo y alquenilo de C11-C21, lineales o ramificados, saturados o insaturados.

Preferiblemente, x y z, idénticos o diferentes, tienen el valor de 0 o 1.

Ventajosamente, y es igual a 1.

Preferiblemente, n, p y r, idénticos o diferentes, tienen el valor de 2 o 3, y aún más particularmente son iguales a 2.

35

El anión es preferiblemente un halogenuro (cloruro, bromuro o yoduro) o un alquilsulfato más particularmente

metilsulfato. Sin embargo, se puede utilizar el metanosulfonato, el fosfato, el nitrato, el tosilato, un anión derivado de ácido orgánico tal como el acetato o el lactato o cualquier otro anión compatible con el amonio con función éster.

El anión X⁻ es aún más particularmente el cloruro o el metilsulfato.

Se utilizan más particularmente las sales de amonio de fórmula (VII) en la que:

- 5 - R15 designa un radical metilo o etilo,
 - x e y son iguales a 1;
 - z es igual a 0 o 1;
 - n, p y r son iguales a 2;
 - R16 se selecciona entre:

- 10 - el radical



- los radicales metilo, etilo o hidrocarbonados de C14-C22
 - el átomo de hidrógeno;
- R18 se selecciona entre:

- 15 - el radical



- el átomo de hidrógeno;
- R17, R19 y R21, idénticos o diferentes, se seleccionan entre los radicales hidrocarbonados de C13-C17, lineales o ramificados, saturados o insaturados, y preferiblemente entre los radicales alquilos y alquenilos de C13-C17, lineales o ramificados, saturados o insaturados.

Ventajosamente, los radicales hidrocarbonados son lineales.

Se pueden citar por ejemplo los compuestos de fórmula (VII) tales como las sales (cloruro o metilsulfato en particular) de diaciloxietil dimetil amonio, de diaciloxietil hidroxietil metil amonio, de monoaciloxietil dihidroxietil metil amonio, de triaciloxietil metil amonio, de monoaciloxietil hidroxietil dimetil amonio y sus mezclas. Los radicales acilos tienen preferiblemente de 14 a 18 átomos de carbono y proceden más particularmente de un aceite vegetal como el aceite de palma o de girasol.

Cuando el compuesto contiene varios radicales acilos, estos últimos pueden ser idénticos o diferentes.

Estos productos se obtienen por ejemplo por esterificación directa de la trietanolamina, de la triisopropanolamina, de alquildietanolamina o de alquildiisopropanolamina eventualmente oxialquiladas sobre unos ácidos grasos o sobre unas mezclas de ácidos grasos de origen vegetal o animal, o por transesterificación de sus ésteres metílicos. Esta esterificación está seguida de una cuaternización con la ayuda de un agente alquilante tal como un halogenuro de alquilo (metilo o etilo preferiblemente), un sulfato de dialquilo (metilo o etilo preferiblemente), el metanosulfonato de metilo, el paratoluensulfonato de metilo, la clorhidrina de glicol o de glicerol.

Unos compuestos de este tipo están comercializados, por ejemplo, bajo las denominaciones DEHYQUART por la compañía HENKEL, STEPANQUAT por la compañía STEPAN, NOXAMNIUM por la compañía CECA, REWOQUAT WE 18 por la compañía REWOWITCO.

La composición según la invención contiene preferiblemente una mezcla de sales de mono, di y triéster de amonio cuaternario con una mayoría en peso de sales de diéster.

Como mezcla de sales de amonio, se puede utilizar por ejemplo la mezcla que contiene de 15 a 30% en peso de metilsulfato de aciloxietil dihidroxietil metil amonio, de 45 a 60% de metilsulfato de diaciloxietil hidroxietil metil amonio y de 15 a 30% de metilsulfato de triaciloxietil metil amonio, teniendo los radicales acilos de 14 a 18 átomos de carbono y procediendo de aceite de palma eventualmente parcialmente hidrogenado. Se pueden citar asimismo las sales de amonio que contienen al menos una función éster descritas en las patentes US-A-4.874.554 y

US-A-4.137.180.

Entre las sales de amonio cuaternario de fórmula (IV) se prefieren, por un lado, los cloruros de tetraalquilamonio como, por ejemplo, los cloruros de dialquildimetilamonio o de alquiltrimetilamonio, en los que el radical alquilo comprende aproximadamente de 12 a 22 átomos de carbono, en particular los cloruros de beheniltrimetilamonio, de diestearildimetilamonio, de cetiltrimetilamonio, de bencil dimetil estearil amonio o también, por otro lado, el cloruro de estearamidopropildimetil (acetato de miristilo) amonio comercializado bajo la denominación "CERAPHYL 70" por la 5 compañía VAN DYK.

Según la invención, el cloruro o el bromuro de beheniltrimetilamonio y el CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) son las sales de amonio cuaternario las más particularmente preferidas.

10 Las partículas de la presente invención pueden ser introducidas en cualquier soporte galénico con fines cosmético, dermatológico y oftálmico. A título de ejemplo, se citarán las lociones, los sueros, los geles y cualquier tipo de emulsión.

15 Los oligonucleótidos de ARN bicatenario (o también dsARN por "double stranded RNA", siARN por "short interfering RNA") utilizables según la presente invención son unos fragmentos de ácidos nucleicos bicatenarios capaces de inhibir total o parcialmente la expresión de un gen en una célula eucariota, comprendiendo estos oligonucleótidos de ARN bicatenario generalmente entre 12 y 40 nucleótidos, preferiblemente de 20 a 25 nucleótidos. Estos nucleótidos bicatenario están compuestos por una hebra sentido y de una hebra antisentido que corresponden a la secuencia del ARN mensajero diana a degradar. El oligonucleótido de ARN bicatenario presenta unos extremos francos o no emparejados de 2 a 6 nucleótidos.

20 Los oligonucleótidos de ARN bicatenario según la invención podrán ser unos oligonucleótidos de ARN bicatenario que comprenden uno o varios nucleótidos modificados por sustitución, delección o inserción, estas modificaciones serán tales que la secuencia del oligonucleótido de ARN bicatenario le permitirá reconocer específicamente un fragmento del ARNm diana del mecanismo de degradación.

25 Los oligonucleótidos de ARN bicatenario podrán presentar asimismo un esqueleto modificado que le confiere, por ejemplo, una mejor estabilidad.

Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster de las hebras de ARN naturales pueden ser modificados para incluir al menos un átomo de nitrógeno o de azufre. Además, los oligonucleótidos de ARN bicatenario según la invención pueden comprender unas bases diferentes de las 4 bases clásicas.

30 La estructura bicatenaria del oligonucleótido de ARN bicatenario se puede obtener mediante el emparejado de dos hebras simples de ARN complementarios o bien mediante una única hebra simple de ARN "autocomplementario", es decir, que comprende dos fragmentos de secuencias complementarias que pueden emparejarse mediante repliegue de la hebra simple para formar una doble hélice.

A título de ejemplo de oligonucleótidos de ARN bicatenario, se pueden citar los descritos en las solicitudes de patente WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 00/44914 o también WO 03/101376.

35 Puede tratarse también de oligonucleótidos de ARN bicatenario denominados "stealth RNA" tales como los vendidos por la compañía Invitrogen y en particular los descritos en las solicitudes de patente US 2004054155 y US 2004014956 que son unos oligonucleótidos de ARN bicatenario modificados de tal manera que uno de sus extremos, por ejemplo y de manera no limitativa, comprende un grupo 2'-O-metilo.

40 Los oligonucleótidos de ARN bicatenario pueden ser sintetizados según numerosos métodos de síntesis *in vivo* o *in vitro* de manera manual o automática.

Los métodos de síntesis *in vitro* pueden ser químicos o enzimáticos, por ejemplo utilizando una ARN polimerasa (a título de ejemplo de T3, T7 o SP6) que realizará la transcripción de un modelo de secuencia de ADN (o de ADNc) seleccionado.

45 Numerosos métodos de síntesis *in vivo* de ARN bicatenario están descritos en la bibliografía, pueden ser realizados en diversos tipos celulares de bacterias o de organismos superiores (Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición (1989), DNA cloning, volumen I y II, D. N. Glover (ed. 1985), Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gaits (ed. 1984), Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames y S. J. Higgins (ed. 1984), Transcription and Translation B. D. Hames y S. J. Higgins (ed. 1984), Animal Cell Culture, R. I. Freshney (ed. 1986), Immobilised Cells and Enzymes, IRL Press (1986), B. Pernal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J. H. Miller y M. P. Calos, Cold Spring Harbor Laboratory (ed. 1987), Methods in Enzymology, vol. 154, Wu y Grossman, y 155, Wu, Mayer y Walker (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology, Academic Press, London, Scopes (1987), Protein Purification: Principle and Practice, 2^a ed., Springer-Verlag, N.-Y. y Handbook of Experimental Immunology, vol. I-IV, C. D. Weir y C. C. Blackwell (1986)). Se puede hacer referencia asimismo a los métodos de síntesis descritos en las solicitudes de patente WO 01/36646, WO 01/75164 y 50 US 20030088087.

El experto en la materia seleccionará una concentración en oligonucleótido de ARN bicatenario adaptada al uso considerado y a la actividad del oligonucleótido seleccionado. Sin que sea limitativo, la concentración en oligonucleótido de ARN bicatenario podrá estar comprendida entre 1 nM y 100 mM.

5 Un segundo objeto de la presente solicitud se refiere a la utilización tópica u ocular de una composición que comprende al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario y de al menos una partícula catiónica de tamaño inferior o igual a 1 μ m, preferiblemente, inferior o igual a 500 nm o 300 nm, de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV seleccionada entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques.

10 Otro objeto de la presente solicitud se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético que comprende la aplicación tópica u ocular de una composición que comprende al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario y de al menos una partícula catiónica de tamaño inferior o igual a 1 μ m, de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV, seleccionada entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques.

15 Con fines de cuidado cosmético, dermatológico, oftálmico o farmacéutico, se busca evitar los métodos invasivos tales como las inyecciones subcutáneas u oculares. Las partículas catiónicas asociadas al siARN según la presente invención pueden ser aplicadas tópicamente sobre la piel, las mucosas o en el ojo, en suspensión o incorporadas en un soporte cosmocéntrico aceptable, como unas lociones, suero, geles emulsionados o no, emulsiones aceite/agua, agua/aceite, múltiples, las microemulsiones, etc. Se tendrá cuidado en que esta introducción en un soporte cosmético no perjudique la estabilidad de las partículas asociadas al siARN.

20 A título de ejemplo no limitativo, la composición según la invención que comprende unos dsARN vectorizados con la ayuda de partículas catiónicas podrá estar destinada a prevenir y/o a tratar el envejecimiento actínico o cronológico, las arrugas, la pérdida de firmeza cutánea de la piel de la cara y/o del cuerpo, los trastornos de la seborrea, las pieles grasas, las pieles secas, las manchas pigmentarias. Estas composiciones también pueden estar destinadas a frenar la caída del cabello, a estimular su crecimiento, a mejorar su calidad, a limitar o impedir el crecimiento de los pelos, etc.

Estas composiciones también pueden estar destinadas a tratar unos desórdenes cutáneos u oftalmológicos.

25 Para favorecer la penetración de las partículas asociadas al siARN, se podrá modificar la permeabilidad de la piel, de esta manera, es posible controlar la permeabilidad de la piel mediante la medición de la PIE (pérdida insensible en agua) con un Tewametre TM210 o un Dermalab - Cortex technology.

Se podrán utilizar, a título de ejemplo, los métodos siguientes:

- "stripping" (corneodisco, "barniz"), peeling químico o dermo-abrasión mecánica;
- pre-tratamiento mediante una mezcla de uno o varios disolventes que tienen un efecto deslipidante;
- limpieza de la piel mediante un producto espumante detergente;
- pre- y/o pos-tratamiento oclusivo, o bien por ejemplo recubriendo la superficie de la piel a tratar con una membrana sintética estanca (Blenderm por ejemplo), o bien mediante la aplicación de una capa de vaselina. Esto tiene como efecto bloquear la PIE natural de la piel y provocar una sobre-hidratación de los lípidos epidérmicos que se vuelven así más permeables.

Después de la aplicación de la composición de la presente invención, se podrán utilizar asimismo unos métodos conocidos por el experto en la materia, que favorecen la penetración de moléculas en el seno de la piel tales como, por ejemplo, la iontoporesis o la electroporación.

40 Por último, la presente solicitud describe la utilización de partículas catiónicas de un tamaño inferior o igual a 1 μ m, de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV seleccionadas entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques, como agente que favorece la penetración tópica u ocular de al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario.

Las figuras siguientes ilustran los ensayos descritos en el ejemplo 2:

I. Reconocimiento celular en Episkin-J6

45 Figura I-1: Block-It Fluorescent Oligo (DAPI)

Figura I-2: Block-It Fluorescent Oligo + Lipofectamina 2000 (DAPI)

Figura I-3: Block-It Fluorescent Oligo + E2 (x 40, DAPI)

Figura I-4: E2 (x 40, DAPI)

Figura I-5: Block-It Fluorescent Oligo + E2 (x 100, DAPI)

Figura I-6: Block-It Fluorescent Oligo + E2 (x 100)

II. Reconocimiento celular en Episkin-J13

Figura II-1: Block-It Fluorescent Oligo (x 40, DAPI)

Figuras IIIA y IIIB: visualización del efecto de formulación que comprende glucósido de octilo y CTAB a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de células HaCaT.

5

Ejemplo 1 - Formulaciones

Micelas catiónicas:

Ejemplo:

- β Glucósido de octilo/bromuro de cetiltriamonio en ratio molar de 5/1
 - 10 E1: 100 mM en agua destilada
 - E2: 50 mM en agua destilada
 - E3: 25 mM en agua destilada
 - E4: 12,5 mM en agua destilada

Los 2 tensioactivos (no iónico + catiónico) se solubilizan en agua destilada. Una suspensión de siARN (20 μ M) se añade entre 1:1 y 1:9 en volumen (siARN: micelas) reduciendo así la concentración micelar en proporción.

15

- Micelas de β glucósido de decilo/cloruro de beheniltriamonio en ratio molar 5/1 en agua destilada. Se realizan las mismas concentraciones que en el ejemplo anterior.

Ejemplo 2 - Reconocimiento celular

El reconocimiento celular y tisular se ha efectuado en el modelo de epidermis reconstruida desarrollado por EPISKIN SNC. Se han seleccionado dos tiempos de cinética de crecimiento del modelo para la aplicación tópica del complejo micela/siARN.

20

- ✓ 1 aplicación el J6 de crecimiento de la epidermis que corresponde a una epidermis al inicio de estratificación y de queratinización.
- ✓ 1 aplicación el J13 de crecimiento de la epidermis que corresponde a una epidermis estratificada y queratinizada.

25

El siARN seleccionado en el Block-It Fluorescent Oligo (20 μ M), tal como se describe en el manual "Block-It Transfection Kit" (Ref. cat. n°: 13750-070, Invitrogen). Se trata de un bicatenario de ARN de 25 nucleótidos acoplado a la fluoresceína. La secuencia codificada no tiene ninguna homología con el genoma humano y lo hace por lo tanto no funcional. Este oligonucleótido ha sido elaborado específicamente para el estudio del reconocimiento celular. Cuando está transfectado, está presente en el citoplasma y penetra también en el núcleo celular.

30

Preparación del complejo micela/siARN:

Se mezclan 3 μ l de Block-It Fluorescent Oligo (20 μ M), tal como se describe en el manual "Block-It Transfection Kit" (Ref. cat. n°: 13750-070, Invitrogen), con 9 μ l de micelas catiónicas E2 (β glucósido de octilo/bromuro de cetiltriamonio en ratio molar de 5/1, 50 mM en agua destilada).

35

Preparación de la mezcla lipofectamina 2000/siARN:

Se diluyen 3 μ l de Block-It Fluorescent Oligo (20 μ M) en 50 μ l de OptiMEM (Invitrogen) y se mezclan con 3 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen) diluida en 12 μ l de OptiMEM según el protocolo del proveedor. La disolución se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la complejación de los liposomas y del siARN.

Preparación de las disoluciones de control:

40

- ✓ se diluyen 3 μ l de Block-It Fluorescent Oligo (20 μ M) en 9 μ l de OptiMEM.
- ✓ se diluyen 9 μ l de micelas catiónicas E2 (β glucósido de octilo/bromuro de cetiltriamonio en ratio molar de 5/1, 50 mM en agua destilada) en 3 μ l de OptiMEM.

Las diferentes mezclas y disoluciones se depositan entonces sobre diferentes muestras de epidermis EPISKIN y se incuban en inmersión durante 48 horas a 37°C/5% de CO₂ en medio de diferenciación proporcionado con el kit

EPISKIN. Las muestras se congelan entonces en una mezcla carbohielo/etanol y se cortan con la ayuda de un criostato (MICROM HM560) en secciones de 5 μ m. Se montan los cortes en un medio de montaje Vectrashield (Vector Laboratories) que contiene 1,5 μ g de DAPI y se visualizan en inmunofluorescencia con los filtros apropiados para la fluoresceína y el DAPI.

5 Observaciones:

- ✓ Epidermis transfectada el J6: se observa que, mientras que la disolución de Block-It Fluorescent Oligo (figura I-1) o la mezcla de Lipofectamina 2000 (figura I-2) no permite la penetración de Block-It Fluorescent Oligo más allá del estrato córneo en formación, la mezcla E2/Block-It Fluorescent Oligo permite la penetración del dúplex ARN en la epidermis (figuras I-3, I-5, I-6). No se detecta ningún marcado no específico cuando E2 se aplica solo (figura I-4). El carácter sorprendente de esta observación se subraya por la presencia homogénea del Block-It Fluorescent Oligo en todas las células de la epidermis mientras que es conocido por el experto en la materia que la transfección clásica es eficaz sólo en las células en proliferación. En la epidermis reconstruida, sólo las células basales proliferan mientras que las células supra-basales se diferencian.
- ✓ Epidermis transfectada el J13: como el D6, la disolución de Block-It Fluorescent Oligo sola no penetra en el estrato córneo (figura II-1). La mezcla E2/Block-It Fluorescent Oligo permite la penetración del dúplex fluorescente en las diferentes capas del estrato córneo y en las diferentes células de la epidermis (figuras II-2, II-3), no obstante con una eficacia y una homogeneidad menor que el J6.

Ejemplo 3 - Efecto de una formulación de glucósido de octilo y de CTAB a diferentes concentraciones sobre la mortalidad de células HaCaT

20 El efecto de la fórmula E2: 50 mM de micelas glucósido de octilo/CTAB en ratio molar 5/1 se realiza mediante una incubación de 4 días según el protocolo siguiente sobre células HaCaT (500 μ l de medio inoculado a 40.000 células/pocillo, B-It : Block-It Fluorescent Oligo (Invitrogen).

Se inoculan 40.000 células HaCaT/pocillo por duplicado en una placa de 24 pocillos en 500 μ l de DMEM completo + 10% de suero de ternera fetal.

25 Se diluye 1 μ l de Block-It Fluorescent Oligo (Invitrogen) en 1-15 μ l de una disolución micelar E2 compuesta por 50 mM de micelas glucósido de octilo/CTAB en ratio molar de 5/1 y se añade al medio de cultivo, es decir una concentración final de disolución micelar de 0,1-1,5 mM.

Las células son incubadas entonces durante 4 días a 37°C con un cambio de medio para una muestra de los duplicados el J1 y después se fotografían.

30 Los resultados obtenidos están representados en las figuras IIIA y IIIB.

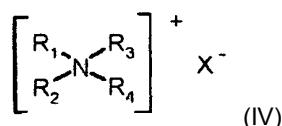
No se observa ninguna diferencia para un mismo tratamiento entre las células con o sin cambio de medio el J1.

Se observa una fuerte mortalidad para las concentraciones de disolución micelar inferior a la CMC (aproximadamente 1 mM) que demuestra el efecto tóxico del vehículo en su forma libre mientras que se observa una buena viabilidad por encima de la CMC (1,5 mM).

REIVINDICACIONES

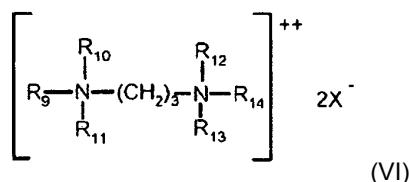
1. Composición tópica u ocular que comprende al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario, caracterizada por que el oligonucleótido de ARN bicatenario se adhiere a la superficie de al menos una partícula catiónica de un tamaño inferior o igual a 1 μm , de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV, comprendiendo dicha partícula al menos un tensioactivo catiónico y siendo seleccionada entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques, siendo dicho tensioactivo catiónico seleccionado entre las sales de amonio cuaternario.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que la partícula catiónica tiene un tamaño inferior o igual a 500 nm.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la partícula catiónica tiene un tamaño inferior o igual a 300 nm.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la partícula catiónica es una micela de tensioactivos anfífilos no iónicos y de tensioactivos catiónicos.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la micela de polímero bloque se selecciona entre una micela de polímero bloque anfílico catiónico, una micela de polímero bloque anfílico no iónico y de polímero bloque anfílico catiónico y una micela de polímero bloque anfílico no iónico y de tensioactivo catiónico.
6. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre:

- las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



20 en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquíleno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquil (C2-C6), alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6)sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

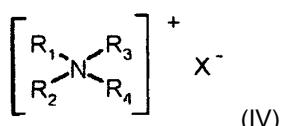
- 25 - las sales de amonio cuaternario del imidazolinio,
- las sales de diamonio cuaternario de fórmula (VI):



30 en la que R9 designa un radical alifático que comprende aproximadamente de 16 a 30 átomos de carbono, R10, R11, R12, R13 y R14, idénticos o diferentes, se seleccionan entre el hidrógeno o un radical alquilo que comprende de 1 a 4 átomos de carbono, y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, acetatos, fosfatos, nitratos y metilsulfatos,

- las sales de amonio cuaternario que contienen al menos una función éster.

7. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



35 en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquíleno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquil (C2-C6), o alquil (C12-C22) acetato; y

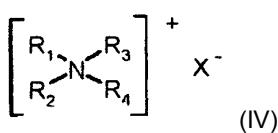
X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

8. Utilización tópica u ocular de una composición que comprende al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario, caracterizada por que el oligonucleótido de ARN bicatenario se adhiere a la superficie de al menos una partícula catiónica de un tamaño inferior o igual a 1 μm , de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV, comprendiendo dicha partícula al menos un tensioactivo catiónico y siendo seleccionada entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques con fines cosméticos, siendo dicho tensioactivo catiónico seleccionado entre las sales de amonio cuaternario.

9. Utilización según la reivindicación 8, caracterizada por que la partícula catiónica tiene un tamaño inferior o igual a 500 nm o 300 nm.

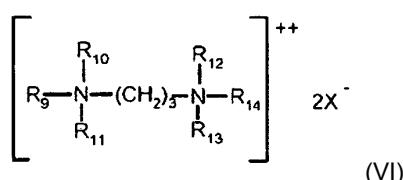
10. Utilización según la reivindicación 8, caracterizada por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre:

- las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquíleno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquilo (C2-C6), alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

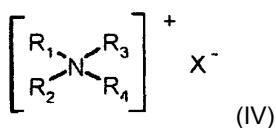
- las sales de amonio cuaternario de imidazolinio,
- las sales de diamonio cuaternario de fórmula (VI):



en la que R9 designa un radical alifático que comprende aproximadamente de 16 a 30 átomos de carbono, R10, R11, R12, R13 y R14, idénticos o diferentes, se seleccionan entre el hidrógeno o un radical alquilo que comprende de 1 a 4 átomos de carbono, y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, acetatos, fosfatos, nitratos y metilsulfatos,

- las sales de amonio cuaternario que contienen al menos una función éster.

11. Utilización según la reivindicación 8, caracterizada por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquíleno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquilo (C2-C6) o alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

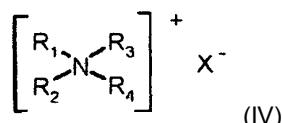
12. Procedimiento de tratamiento cosmético que comprende la aplicación tópica de una composición que comprende al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario, caracterizado por que el oligonucleótido bicatenario se adhiere a la superficie de al menos una partícula catiónica de un tamaño inferior o igual a 1 μm , de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV, comprendiendo dicha partícula al menos un tensioactivo catiónico y siendo seleccionada entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques, siendo dicho tensioactivo catiónico seleccionado entre las sales de amonio cuaternario.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que la aplicación tópica está precedida de un pretratamiento de la piel seleccionado entre un "stripping", un "peeling" químico, una dermo-abrasión mecánica, la aplicación de uno o varios disolventes que tienen un efecto deslipidante, la limpieza de la piel mediante un producto espumante detergente.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 12 o 13, caracterizado por que la aplicación tópica está seguida de un pos-tratamiento oclusivo.

15. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre:

- las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:

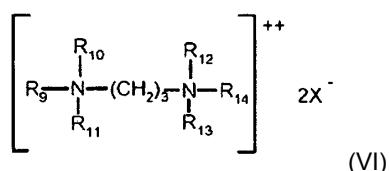


10

en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquileno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquilo (C2-C6), o alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

15

- las sales de amonio cuaternario del imidazolinio,
- las sales de diamonio cuaternario de fórmula (VI):



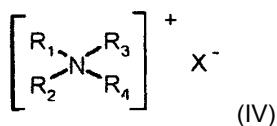
20

en la que R9 designa un radical alifático que comprende aproximadamente de 16 a 30 átomos de carbono, R10, R11, R12, R13 y R14, idénticos o diferentes, se seleccionan entre el hidrógeno o un radical alquilo que comprende de 1 a 4 átomos de carbono, y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, acetatos, fosfatos, nitratos y metilsulfatos,

- las sales de amonio cuaternario que contienen al menos una función éster.

25

16. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



30

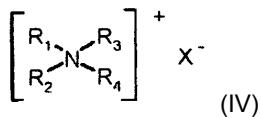
en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquileno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquilo (C2-C6), o alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

35

17. Utilización de partículas catiónicas de un tamaño inferior o igual a 1 μm , de potencial zeta comprendido entre 10 y 80 mV, comprendiendo dicha partícula al menos un tensioactivo catiónico y siendo seleccionada entre las micelas de tensioactivos y las micelas de polímeros bloques como agente que favorece la penetración tópica u ocular de al menos un oligonucleótido de ARN bicatenario, siendo dicho tensioactivo seleccionado entre las sales de amonio cuaternario.

18. Utilización según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre:

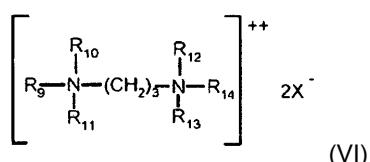
- las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquíleno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquilo (C2-C6), o alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.

5

- las sales de amonio cuaternario del imidazolinio,
- las sales de diamonio cuaternario de fórmula (VI):



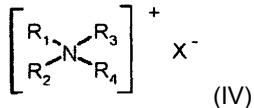
10

en la que R9 designa un radical alifático que comprende aproximadamente de 16 a 30 átomos de carbono, R10, R11, R12, R13 y R14, idénticos o diferentes, se seleccionan entre el hidrógeno o un radical alquilo que comprende de 1 a 4 átomos de carbono, y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, acetatos, fosfatos, nitratos y metilsulfatos,

15

- las sales de amonio cuaternario que contienen al menos una función éster.

19. Utilización según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha sal de amonio cuaternario se selecciona entre las sales de amonio cuaternario de fórmula general (IV) siguiente:



20

en la que los radicales R1 a R4, idénticos o diferentes, representan un radical alifático, lineal o ramificado, seleccionado entre los radicales alquilo, alcoxi, alquilamida o hidroxialquilo que comprenden de 1 a 30 átomos de carbono, los radicales polioxialquíleno (C2-C6), alquil (C12-C22) amido alquilo (C2-C6), o alquil (C12-C22) acetato; y X es un anión seleccionado en el grupo de los halogenuros, fosfatos, acetatos, lactatos, alquil (C2-C6) sulfatos, alquil- o alquilarilsulfonatos.



Fig. I-1 : Block-It Fluorescent Oligo (DAPI)



Fig. I-2 : Block-It Fluorescent Oligo + Lipo-fectamina 2000 (DAPI)

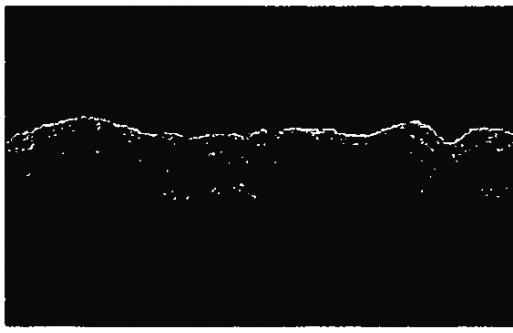


Fig. I-3 : Block-It Fluorescent Oligo + E2 (x 40, DAPI)



Fig. I-4 : E2 (x 40, DAPI)



Fig. I-5 : Block-It Fluorescent Oligo + E2 (x 100, DAPI)



Fig. I-6 : Block-It Fluorescent Oligo + E2 (x 100)



Fig. II-1 : Block-It Fluorescent Oligo (x 40, DAPI)



Fig. II-2 : Block-It Fluorescent Oligo + E2
(x 40, DAPI)



Fig. II-3 : Block-It Fluorescent Oligo + E2
(x 40)

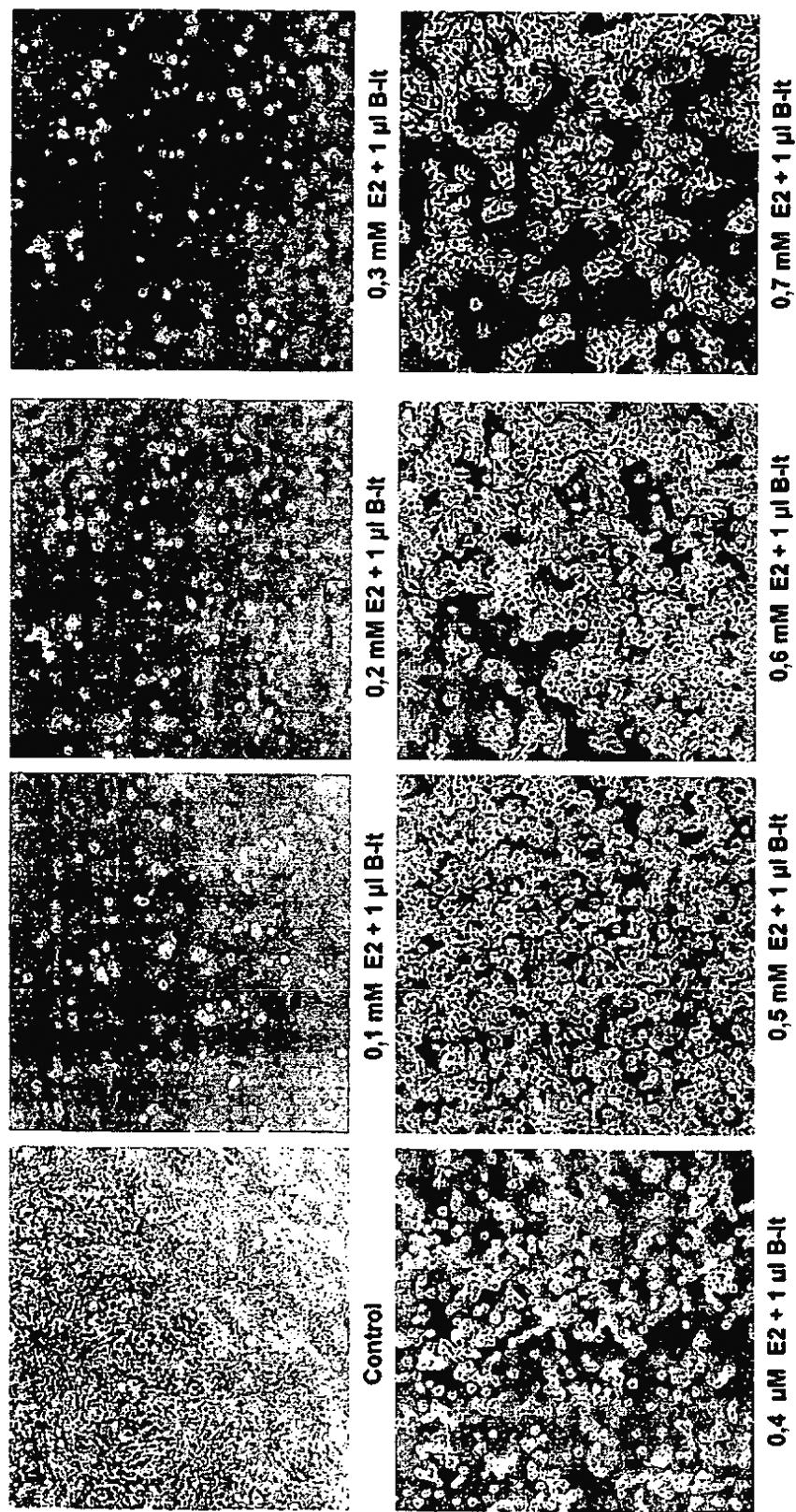


Figura IIIA

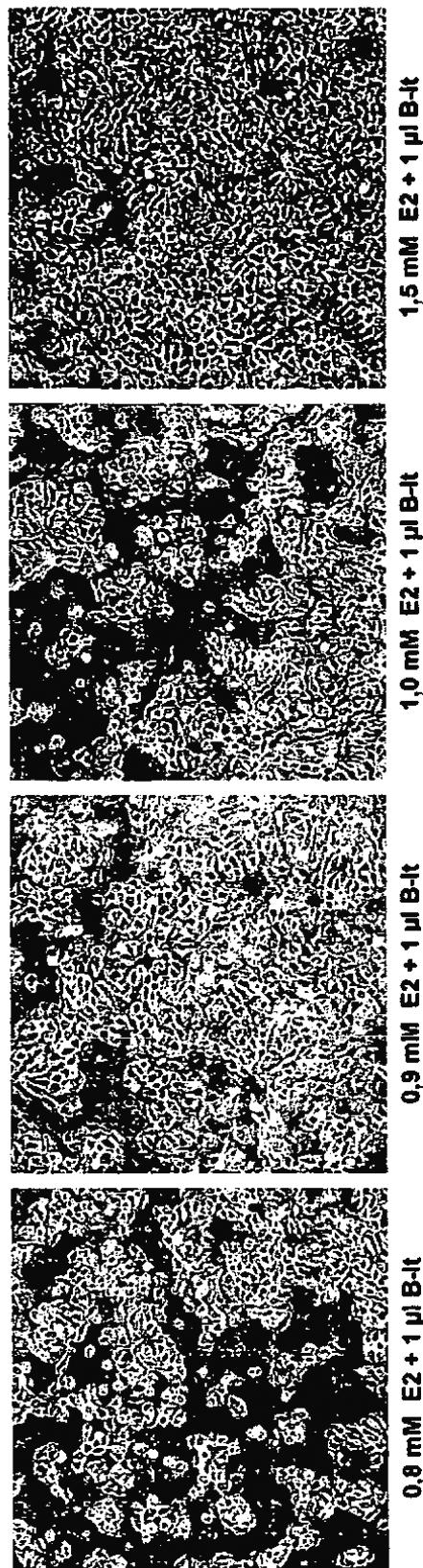


Figura III B