

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 115**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2011 PCT/EP2011/054512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11117334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011 E 11709739 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2549980**

54 Título: **Sistema de micelas inversas que comprenden ácidos nucleicos y su uso**

30 Prioridad:

**24.03.2010 US 317050 P**  
**24.03.2010 EP 10305299**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2017**

73 Titular/es:

**MEDESIS PHARMA (100.0%)**  
**L'Orée des Mas Avenue du Golf**  
**34670 Baillargues, FR**

72 Inventor/es:

**MAUREL, JEAN-CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 614 115 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**

Sistema de micelas inversas que comprenden ácidos nucleicos y su uso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un sistema de micelas inversas basado en esteroides, acilglicérols, fosfolípidos o esfingolípidos y ácidos nucleicos. El sistema de micelas inversas de la invención es capaz de atravesar las membranas mucosas y celulares. Por tanto, permite la vectorización de ácidos nucleicos a sitios diana. Es ventajosamente útil en los campos farmacéutico y dietético.

**Antecedentes de la invención**

10 Las estrategias de RNAi (interferencia por RNA) y antisentido (AS) consisten en silenciar la expresión de un gen diana por el uso de ácidos nucleicos que permiten la degradación o la detención de la traducción del mRNA diana. Las nuevas aplicaciones antisentido (salto de exón, corrección alternativa de corte y empalme), enmascarando la mutación responsable de un defecto alternativo de corte y empalme, han permitido la síntesis de una proteína funcional. Los aptámeros son ácidos nucleicos capaces de interactuar con una proteína diana y sub-regular su síntesis. El descubrimiento de todos estos ácidos nucleicos y más recientemente siRNA, miRNA y RNAa ha abierto  
15 amplias perspectivas en terapéutica para el tratamiento de enfermedades como enfermedades genéticas, cánceres, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades infecciosas e inflamatorias o el bloqueo de la proliferación celular y de enfermedades causadas por ella.

20 Sin embargo, estas moléculas son inestables en los fluidos biológicos, *in vitro* e *in vivo*, presentan una mala penetración intracelular y baja biodisponibilidad. Estos inconvenientes críticos han limitado su uso en terapéutica. Como resultado, las aplicaciones clínicas de dichos ácidos nucleicos han requerido modificaciones químicas con el fin de retener su capacidad para inactivar la expresión de las proteínas aumentando mientras la estabilidad y penetración celular. Los grupos de investigación han aplicado también métodos nanotecnológicos para mejorar su suministro, para superar la mayoría de las barreras que dificultaban el desarrollo de terapias basadas en el suministro de ácidos nucleicos. Para mejorar la biodisponibilidad, muchos investigadores han intentado también  
25 utilizar vías de administración alternativas: ocular, dérmica, oral, intramuscular. Estos intentos no han sido hasta ahora totalmente satisfactorios. Por ejemplo, algunos de estos intentos, más específicamente ensayos con ácidos nucleicos en vehículos de liposomas han estimulado la respuesta inmunitaria.

30 Los inventores habían descubierto previamente que podían obtenerse complejos a partir de dos compuestos orgánicos aislados de extractos de plantas y constituidos respectivamente de sitosterol y acilglicérols y agentes terapéuticos hidrosolubles (WO2006/048772), siendo estos complejos agentes particularmente eficaces como vectores de dichos agentes terapéuticos que atraviesan las mucosas. Dicha vectorización de agentes terapéuticos hidrosolubles produce una importante disminución de las cantidades administradas en comparación con su administración en ausencia de micelas como se ha descrito anteriormente.

35 Dichos complejos se han mostrado eficaces para vectorizar agentes terapéuticos hidrosolubles por administración inmediata a las mucosas. Sin embargo la estabilidad de microemulsiones que contienen agentes terapéuticos no es siempre satisfactoria para permitir su desarrollo como sistemas de suministro de, por ejemplo, fármacos y/o compuestos dietéticos. Dicho desarrollo requiere formulaciones que sean estables durante períodos de tiempo más largos, por ejemplo durante varias semanas o meses, a temperatura ambiente.

40 Un objeto de la presente invención es superar las desventajas de la técnica anterior. Existe una necesidad evidente de una estrategia terapéutica de ácidos nucleicos segura y eficaz y en particular de nuevas herramientas que sean capaces de lograr una terapia basada en la modulación eficaz de la expresión génica. Más particularmente, un objeto de la invención es proporcionar un sistema de suministro de fármacos que comprende un ácido nucleico, en particular un oligonucleótido, que puede ser, por ejemplo, administrado a través de las mucosas, dando lugar a una biodisponibilidad satisfactoria del fármaco en una forma activa.

45 La incorporación de un fosfolípido o un esfingolípidos, en particular en cantidades específicas, en la formulación de microemulsiones que comprenden altas dosis de ácido nucleico provocó sorprendentemente un aumento importante de su estabilidad.

50 La presente invención describe nuevas formulaciones en microemulsiones capaces de vectorizar altas cantidades de ácidos nucleicos, su proceso de preparación y su uso como sistemas de suministro de fármacos y/o compuestos dietéticos. Cantidades "altas" se refieren en la presente memoria a cantidades suficientes para obtener una actividad terapéutica a escala humana, pero que permanecen muy inferiores a las cantidades de ácido nucleico suministradas en ausencia de complejos.

Esta formulación hace ventajosamente posible el control y la optimización de la composición que comprende micelas para su uso en los campos farmacéutico y dietético.

**55 Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema de suministro para la liberación de un ácido nucleico, aplicado preferiblemente a través de las mucosas, así como a las composiciones y métodos para preparar el sistema de suministro. En la presente memoria se describen sistemas de micelas inversas diseñados para alcanzar este objetivo de una manera segura y controlada. Los sistemas de micelas inversas son capaces de ser absorbidos por las mucosas y vectorizar los ácidos nucleicos bajo una forma protegida a cualquier tejido del organismo.

Más particularmente, la presente invención proporciona un sistema de transporte de micelas inversas para la dispensación de un ácido nucleico, en particular un oligonucleótido, capaz de interacción con pre-mRNA, mRNA o una proteína, y la modulación de la expresión génica. Más específicamente, las micelas inversas de acuerdo con la invención promueven la absorción del ácido nucleico a través de las barreras epiteliales de las mucosas y permiten que el ácido nucleico se internalice en las células diana. Las micelas inversas de la invención comprenden más específicamente al menos un ácido nucleico, en particular un oligonucleótido, capaz de modular la expresión génica, un esterol, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol y agua.

Las micelas inversas se pueden preparar de acuerdo con un método descrito a continuación utilizando al menos un esterol, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol y agua.

Dichas micelas son más particularmente obtenibles por el método siguiente:

(a) poner en contacto (i) esterol, preferiblemente sitosterol o colesterol, (ii) acilglicerol, preferiblemente diacilglicerol, (iii) fosfolípidos, preferiblemente fosfatidilcolina, o esfingolípidos, (iv) alcohol, (v) agua, preferiblemente agua purificada y (vi) al menos un ácido nucleico, en particular un oligonucleótido, capaz de modular la expresión génica,

(b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a) a 40°C o menos, y durante un tiempo suficiente para obtener la formación de micelas inversas.

Los parámetros de agitación, por ejemplo la duración y la velocidad de agitación mecánica, pueden ser determinados fácilmente por cualquiera experto en la técnica y dependen de las condiciones experimentales. En la práctica, estos parámetros son tales que se obtenga una microemulsión; la velocidad se determina con el fin de permitir la formación de una formulación visualmente límpida, y la duración de la agitación es tal que la agitación se pueda detener unos minutos después de la obtención de la formulación visualmente límpida.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende las micelas inversas de la invención y un vehículo, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

### Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción se refiere a realizaciones preferidas solamente como ejemplos y sin limitación a la combinación de las características necesarias para implementar la invención.

#### Micelas inversas

El sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención se caracteriza como una microemulsión que comprende una dispersión de nanogotitas de agua en aceite. La dispersión es estabilizada por dos tensioactivos (un acilglicerol, más preferiblemente un diacilglicerol, y un fosfolípido, más preferiblemente fosfatidilcolina, o un esfingolípido) y un co-tensioactivo (alcohol) que están más probablemente en la interfase agua/aceite. Las micelas inversas se pueden definir como un sistema en el que el agua forma la fase interna y las colas hidrófobas de los lípidos forman la fase continua. Las micelas inversas que contienen aceite(s), tensioactivo(s), co-tensioactivo(s) y una fase acuosa también se caracterizan como microemulsiones de agua en aceite. Estas microemulsiones son termodinámicamente estables y visualmente límpidas.

Generalmente, el tamaño de las micelas de acuerdo con la invención es muy pequeño, más particularmente, es menor que 10 nm; más específicamente, es menor que 8 nm y más preferiblemente menor que 6 nm. El tamaño puede variar con la cantidad de agua y fosfolípidos o esfingolípidos añadidos. La presente invención se refiere más particularmente a micelas inversas con un núcleo acuoso de 4 nm, preferiblemente de 3 a 5 nm, más preferiblemente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm.

Las micelas inversas y el tamaño de su núcleo acuoso se pueden caracterizar por varios métodos, que incluyen:

- Dispersión de rayos X en ángulos pequeños (abreviadamente SAXS, por sus siglas en inglés *Small Angle X-Ray Scattering*)
- Dispersión de neutrones
- Microscopía electrónica de transmisión (abreviadamente TEM, por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*)
- Dispersión dinámica de luz (abreviadamente DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*)

Las relaciones de los constituyentes lipídicos (que incluyen esteroles, acilglicerol y fosfolípido o esfingolípido) en el sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención pueden variar. Por ejemplo, la relación en peso esteroles/acilglicerol puede variar desde 0,015 hasta 0,05, más en particular desde 0,03 hasta 0,04.

5 La relación en peso fosfolípido o esfingolípido/acilglicerol puede variar desde 0,05 hasta 0,40, en particular desde 0,06 hasta 0,25. El peso de fosfolípido o esfingolípido corresponde respectivamente al peso total de la mezcla de fosfolípidos o esfingolípidos, por ejemplo, el peso de lecitina, utilizado en la formulación. Similarmente, el peso de acilglicerol corresponde al peso total de la mezcla que contiene generalmente un acilglicerol, o una mezcla de acilgliceroles, con glicerol y ácidos grasos derivados de dicho(s) acilglicerol(es).

10 Los compuestos del sistema de micelas inversas pueden ser analizados por medios adecuados. Más específicamente, los esteroides se pueden identificar por análisis cromatográfico de gases y el acilglicerol por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en particular con un detector de dispersión de la luz, en una columna de sílice, en presencia de un eluyente, por ejemplo, acetonitrilo isocrático. La cromatografía de gases también se puede utilizar para analizar diacilgliceroles. Los fosfolípidos y esfingolípidos pueden ser analizados por  
15 cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con una columna de diol con un detector de dispersión de la luz.

Las micelas inversas son sistemas dinámicos. El movimiento browniano provoca colisiones perpetuas de las micelas, lo que conduce a la coalescencia de las micelas y al intercambio de los núcleos acuosos. Se produce la separación y regeneración de las micelas lo que permite las reacciones químicas entre diferentes soluciones. La velocidad de intercambio entre las micelas aumenta en particular con la temperatura, la longitud de las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo y la relación agua/tensioactivo. En el contexto de la invención, los núcleos acuosos de las micelas deben tener un tamaño específico que permita que una o más moléculas de ácido nucleico, en particular el oligonucleótido, capaces de modular la expresión génica, sean estabilizadas en las micelas preparadas. Como se ha mencionado anteriormente, el tamaño del núcleo acuoso es preferiblemente alrededor de 4 nm, más preferiblemente de 3 a 5 nm, más específicamente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm.

25 Las micelas inversas pueden existir en el sistema de la invención como diferentes organizaciones estructurales, tales como por ejemplo esferas, cilindros o cilindros ramificados.

Sin estar vinculado a ninguna teoría, parece que la inclusión de un fosfolípido o un esfingolípido en el sistema de micelas inversas permite la formación de micelas estables con mayor diámetro y volumen, lo que permite la vectorización de mayores cantidades de ácido nucleico. Este aumento en las cantidades de ácido nucleico vectorizado proporciona vectorización de cantidades suficientes para obtener una actividad terapéutica. La incorporación del fosfolípido o esfingolípido en el sistema de micelas inversas confiere además una mayor estabilidad a las microemulsiones, en particular a las microemulsiones que contienen altas cantidades de ácido nucleico.

35 El sistema de micelas inversas de la invención asegura la absorción de los compuestos que son suministrados a través de las mucosas, preferiblemente a través de las mucosas bucal, nasal y/o rectal, más preferiblemente a través de la mucosa bucal. También, las micelas inversas de la presente invención proporcionan una biodisponibilidad importante con baja variabilidad de la absorción.

#### Método para preparar micelas inversas

40 En una realización particular, la invención se refiere a un método para preparar micelas inversas que presentan un núcleo acuoso de alrededor de 4 nm, preferiblemente de 3 a 5 nm, más preferiblemente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm y que implican al menos un ácido nucleico, en particular un oligonucleótido, capaz de modular la expresión génica, un esteroles, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol y agua, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

45 (a) poner en contacto (i) esteroles, (ii) acilglicerol, preferiblemente diacilglicerol, (iii) fosfolípido, preferiblemente fosfatidilcolina, o esfingolípido, (iv) alcohol, (v) agua, preferiblemente agua purificada, y (vi) al menos un ácido nucleico, en particular un oligonucleótido, capaz de modular la expresión génica,

(b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a), a 40°C o menos, y durante un tiempo suficiente para obtener la formación de micelas inversas.

50 Las micelas inversas obtenidas y recuperadas son entonces particularmente útiles como un sistema de suministro de ácidos nucleicos. La etapa (b) del procedimiento es de particular importancia ya que permite obtener micelas inversas, siendo entonces dichas micelas inversas útiles como un sistema de transporte para suministrar el ácido nucleico a los sitios diana. Los sitios diana pueden ser, por ejemplo, células de un tejido específico.

55 En una realización particular, el ácido nucleico se solubiliza en primer lugar en agua (preferiblemente agua purificada) para formar una mezcla acuosa. Dicha mezcla acuosa se introduce luego en la mezcla oleosa (etapa (a)). La mezcla oleosa comprende preferiblemente al menos un esteroles, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, y un alcohol.

Los compuestos implicados en la etapa (a) se describirán con más detalles a continuación.

5 La agitación de la mezcla obtenida en la etapa (a) se realiza a una temperatura menor o igual a 40°C, variando específicamente de 15°C a 40°C, o más preferiblemente de 25°C a 40°C, o más específicamente de 30°C a 37°C. El tiempo suficiente puede variar en particular según la técnica de agitación utilizada. El tiempo de agitación es en cualquier caso el tiempo necesario para convertir la mezcla inicial en una solución de micelas inversas visualmente límpida.

10 Un experto en la técnica sabe cómo seleccionar excipientes o componentes que se puedan utilizar junto con la composición de acuerdo con la presente invención, con el fin de mantener sus propiedades beneficiosas. En particular, la presencia de glicerol puede, cuando se introduce en gran cantidad, evitar la formación de micelas inversas o romper el sistema de micelas inversas. Más específicamente, no más de 2,5% (porcentaje expresado en peso de glicerol/peso de acilglicerol) se utiliza para la preparación de las micelas inversas de la presente invención.

En la etapa (a) se pueden introducir otros compuestos. Se pueden citar por ejemplo, agentes colorantes y/o sustancias aromatizantes.

15 De manera ventajosa, los compuestos antes citados o las mezclas comercialmente disponibles que los contienen son los únicos ingredientes introducidos para preparar el sistema de micelas y por consiguiente los únicos presentes en el sistema de micelas de la invención.

La agitación de la etapa (b) puede ser realizada, por ejemplo, por agitación mecánica.

Los aparatos usuales pueden ser hélices cuyos movimientos rápidos generan turbulencias y remolinos que permiten la interpenetración de las partículas y la formación de micelas inversas dentro de la mezcla.

20 La velocidad de agitación mecánica varía preferiblemente de 100 a 2000 r/minuto, más preferiblemente de 300 a 700 r/minuto. Los volúmenes, dispositivo y velocidad de agitación implementados dependen y deben adaptarse a los reaccionantes y sus cantidades.

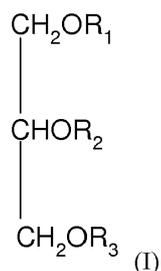
La temperatura varía más específicamente de 15°C a 40°C, o de 25°C a 40°C, o incluso más específicamente de 30°C a 37°C.

## 25 **Compuestos de micelas inversas**

### **Acilglicerol**

Los acilgliceroles útiles para la preparación del sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención se pueden aislar de la mayoría de animales y más preferiblemente de las plantas.

30 Los acilgliceroles incluyen mono-, di- y tri-acilgliceroles. En una realización particular, los acilgliceroles utilizados preferiblemente en la presente invención tienen la fórmula (I) siguiente:



en la cual:

35 - R<sub>1</sub> es un residuo acilo de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, un átomo de hidrógeno, o una mono-, di- o tri-galactosa o glucosa;

- R<sub>2</sub> es un residuo acilo de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, que tiene entre 2 y 18 átomos de carbono;

40 - R<sub>3</sub> es un residuo acilo de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, o un átomo de hidrógeno.

De acuerdo con una realización particular, R<sub>1</sub> o R<sub>3</sub>, preferiblemente sólo uno de R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub>, en particular sólo R<sub>1</sub>, representa un residuo acilo de ácido oleico (C18: 1[cis]-9).

De acuerdo con un aspecto particular, R<sub>2</sub> tiene un enlace insaturado (por ejemplo, enlace etilénico) y tiene ventajosamente 18 átomos de carbono, preferiblemente R<sub>2</sub> es un residuo de ácido oleico (grupo oleilo), uno de sus isómeros posicionales respecto al doble enlace (cis-6,7,9,11 y 13) o uno de sus isómeros iso-ramificados.

De acuerdo con otro aspecto particular, R<sub>1</sub> representa un grupo oleilo.

- 5 De acuerdo con otro aspecto particular, R<sub>2</sub> representa un grupo acetilo.

De acuerdo con otro aspecto particular, R<sub>3</sub> es un átomo de hidrógeno.

Como regla general, se elegirá un aceite que contenga una alta concentración de ácido oleico como una fuente útil de acilglicérols de acuerdo con la invención. Dicho aceite contiene generalmente una alta proporción de acilglicérols útiles de acuerdo con la invención.

- 10 De acuerdo con un aspecto particular de la invención, los diacilglicérols preferidos se seleccionan del grupo que consiste en 1,2-dioleoilglicérol (o también denominado en la presente memoria 1,2-dioleína) y 1-oleoil-2-acetilglicérol.

- 15 También están disponibles comercialmente cierto número de ellos, y más particularmente los que se cree que son los más activos en las aplicaciones deseadas. Este es el caso particularmente de 1-oleoil-2-acetilglicérol y 1,2-dioleoilglicérol. El monooleato de glicérol 40 contiene aproximadamente 33% de dioleoilglicérol y alrededor del 11% de 1,2-dioleína y es aceptado farmacéuticamente (*Farmacopea Europea* (4<sup>a</sup> edición), *USP 25/NF20* y *Norma Japonesa de Aditivos Alimentarios*). Dicho producto está comercialmente disponible, por ejemplo, por Gattefossé Company con el nombre PECEOL<sup>®</sup>.

- 20 Los acilglicérols se incorporan preferiblemente o están comprendidos en la composición o en el sistema de micelas inversas en una cantidad en peso que varía de 50 g a 90 g respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención. Las cantidades especificadas en la presente memoria se adaptarán respecto a los otros compuestos de modo que correspondan más específicamente a las relaciones en peso identificadas más adelante.

#### **Esteroles**

- 25 Los esteroles útiles para la preparación del sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención son preferiblemente esteroles naturales, tal como colesterol, o fitosteroles (esteroles vegetales). El sitosterol y el colesterol son los esteroles preferidos útiles para el sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención.

- 30 El sitosterol y el colesterol están disponibles comercialmente. Más particularmente, se puede utilizar el sitosterol comercial que se extrae de la soja. En dicho producto, el sitosterol representa generalmente de 50 a 80% en peso del producto y se encuentra generalmente en una mezcla con campesterol y sitostanol en las proporciones respectivas del orden de 15% cada uno. También se puede utilizar el sitosterol comercial que se extrae de una variedad de aceite de pino denominado taloil. En general, será posible usar sitosterol en mezcla con sitostanol. Preferiblemente, dicha mezcla comprende al menos 50% de sitosterol en peso de la mezcla.

- 35 Como se ha mencionado anteriormente, las relaciones de los constituyentes lipídicos (esteroles, acilglicérol y fosfolípidos o esfingolípidos) en el sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención puede variar. Preferiblemente, la relación en peso esterol/acilglicérol puede variar de 0,015 a 0,05, más particularmente de 0,03 a 0,04. El peso de esterol corresponde en la presente invención al peso total de los esteroles utilizados en la formulación, por ejemplo, el peso de fitosterol.

- 40 Los esteroles se incorporan o están comprendidos preferiblemente en la composición o en el sistema de micelas inversas en una cantidad en peso que varía de 0,825 g a 4,5 g respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención. Las cantidades especificadas en la presente memoria se adaptarán respecto a los otros compuestos de forma que se correspondan más específicamente a las relaciones en peso identificadas anteriormente y/o más adelante.

#### **Fosfolípidos y esfingolípidos**

- 45 Los fosfolípidos están formados por un glicérol unido a 2 ácidos grasos y a un grupo fosfato. La variabilidad de fosfolípidos depende de los ácidos grasos que están unidos al glicérol y de los grupos químicos que son susceptibles de unirse con el grupo fosfato. Los fosfolípidos son, con los esfingolípidos, los principales constituyentes lipídicos de las membranas biológicas.

- 50 Entre los fosfolípidos útiles en la presente invención se pueden citar fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicérol, difosfatidilglicérol, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina.

En una realización particular, el fosfolípido es fosfatidilcolina. La fosfatidilcolina es también conocida como 1,2-diacilglicero-3-fosfocolina o PtdCho.

5 La fosfatidilcolina se forma a partir de una colina, un grupo fosfato, un glicerol y dos ácidos grasos. Realmente, es un grupo de moléculas, en el que las composiciones de ácidos grasos varían de una molécula a otra. La fosfatidilcolina se puede obtener a partir de lecitina comercial que contiene fosfatidilcolina en concentraciones en peso de 20 a 98%. La lecitina usada preferiblemente para la preparación de las micelas inversas de acuerdo con la invención es Epikuron 200® y contiene fosfatidilcolina a una concentración mayor del 90%.

Los esfingolípidos son una clase de lípidos derivados del aminoalcohol alifático esfingosina. Entre los esfingolípidos que se pueden utilizar en la presente invención se pueden citar acilesfingosina, esfingomielinas, glicoesfingolípidos y gangliósidos.

10 El sistema de micelas inversas de la invención puede comprender fosfolípidos, esfingolípidos, o una mezcla de ambos tipos de compuestos, preferiblemente fosfolípidos.

De acuerdo con una realización específica, el sistema de micelas inversas de la invención comprende fosfolípidos.

La relación en peso fosfolípido y/o esfingolípidos/acilglicerol en las composiciones o sistemas de micelas inversas de acuerdo con la invención es de 0,05 a 0,40, preferiblemente de 0,06 a 0,25.

15 Los fosfolípidos o esfingolípidos se incorporan o están comprendidos preferiblemente en la composición o en el sistema de micelas inversas en una cantidad en peso que varía de 1 g a 30 g, preferiblemente de 5 g a 20 g, respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención. Las cantidades especificadas en la presente memoria se adaptarán respecto a los otros compuestos de modo que se correspondan más específicamente a las relaciones en peso antes identificadas.

#### Alcoholes

20 Los alcoholes útiles para la preparación del sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención son preferiblemente monoalcoholes lineales o ramificados de C2 a C6. Ejemplos de alcoholes son etanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol y cualquiera de sus mezclas. En una realización particular de la invención, el alcohol es etanol.

25 El alcohol se incorpora o está comprendido preferiblemente en la composición o en el sistema de micelas inversas en una cantidad en peso que varía de 5 g a 12 g respecto a 100 g del peso total de la composición o sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención.

#### Agua

El agua útil para la preparación del sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención es preferiblemente agua purificada, más preferiblemente agua exenta de RNAsa o DNAsa.

30 El agua se incorpora o está comprendida preferiblemente en la composición o en el sistema de micelas inversas en una cantidad en peso que varía de 1 g a 15 g, preferiblemente de 5 g a 15 g, respecto a 100 mL del volumen total de la composición o sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención.

35 Un experto en la técnica adaptará la cantidad de fosfolípido o esfingolípidos en los sistemas a la cantidad deseada de agua. Por ejemplo, el aumento de cantidad de agua debe implicar el aumento de cantidad de fosfolípido o esfingolípidos en los sistemas.

#### Ácidos nucleicos

En la presente invención, el término "ácido nucleico" se refiere a cualquier ácido nucleico capaz de interactuar con mRNA, pre-mRNA o una proteína y capaz de modular la expresión génica. Los ácidos nucleicos preferidos son capaces de sobre-regular o sub-regular la expresión de la(s) proteína(s) diana.

40 El término "ácido nucleico" incluye cualquier DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA (ácido ribonucleico). Los términos incluyen RNA monocatenario, DNA monocatenario, RNA bicatenario, DNA bicatenario, DNA plasmídico, RNA aislado, tal como RNA parcialmente purificado, RNA esencialmente puro, RNA sintético, RNA producido de forma recombinante, aptámeros, así como ácidos nucleicos que comprenden nucleótidos no estándares, tales como nucleótidos de origen no natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Se pueden citar por ejemplo gápmers.

45 Por "oligonucleótido" se entiende un ácido nucleico que comprende de 5 a 100 nucleótidos, preferiblemente de 10 a 90 nucleótidos, más preferiblemente de 13 a 80 nucleótidos, más particularmente de 13 a 25 nucleótidos.

50 Los términos "oligonucleótidos antisentido", "ácido nucleico interferente pequeño" (siNA), "RNA interferente pequeño" (siRNA), "molécula de ácido nucleico interferente pequeña", "molécula de oligonucleótido interferente pequeña", "miRNA", "micro RNA", "activación de RNA" (RNAa), "RNA pequeño en horquilla" (shRNA) y "aptámeros", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de modular la expresión génica por sobre-regulación o sub-regulación (por ejemplo, silenciamiento de genes) de la expresión de la

proteína diana de una manera específica de la secuencia. Las diversas estrategias de ácido nucleico para modular la expresión génica se describen a continuación.

#### 1. Estrategia de la interferencia por RNA

5 La interferencia por RNA (RNAi) describe un procedimiento en el que el RNA bicatenario (dsRNA), cuando está presente dentro de una célula, inhibe la expresión de un gen endógeno que tenga una secuencia idéntica o casi idéntica a la del dsRNA (RNA bicatenario). La inhibición es producida por la degradación específica del RNA mensajero (mRNA) transcrito a partir del gen diana. Con mayor detalle, la interferencia por RNA describe un procedimiento de silenciamiento génico post-transcripcional específico de una secuencia en animales mediado por la expresión de los "RNA interferentes pequeños" (siRNA) después de una escisión *in situ* (Brummelkamp T.R., et al., 10 2002). El proceso básico inicial implica el/los dsRNA que es/son procesados por escisión en unidades más pequeñas (las llamadas siRNA) que guían el reconocimiento y la escisión dirigida del RNA mensajero homólogo diana (mRNA).

Por consiguiente, el método no requiere manipulaciones genéticas que consumen tiempo, como las necesarias para las estrategias clásicas de inactivación de genes, y por lo tanto han surgido como una herramienta valiosa en la 15 genética molecular, que también se puede aplicar a la terapia humana.

El mecanismo conocido actualmente de RNAi se puede describir como sigue:

El procesamiento de dsRNA para convertirlo en siRNA, que a su vez induce la degradación del mRNA diana deseado, es un proceso de degradación de RNA en dos etapas. La primera etapa implica una actividad de endonucleasa de dsRNA (similar a ribonucleasa III; similar a RNasa III) que procesa el dsRNA en RNA más 20 pequeños sentido y antisentido, que más frecuentemente tienen una longitud en el intervalo de 19 a 25 nucleótidos (nt), dando lugar a los llamados RNA interferentes pequeños (siRNA). Esta proteína del tipo RNasa III se denomina "Dicer". En una segunda etapa, los siRNA antisentido producidos se combinan, y sirven como guías, con un complejo de ribonucleasa diferente denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), que permite la reasociación del siRNA y el mRNA monocatenario homólogo diana, y la escisión de los mRNA monocatenarios homólogos diana. Se ha observado que la escisión del mRNA diana tiene lugar en el centro de la región dúplex complementaria con la cadena antisentido del dúplex de siRNA y el mRNA diana deseado (Dykxhoorn D. M. et al., 2003).

Una alternativa al siRNA es un plásmido que codifica el siRNA en horquilla, que se denomina estrategia de shRNA (RNA pequeño en horquilla). En la célula, se genera RNA en horquilla e interacciona con la proteína Dicer, dando 30 como resultado un siRNA funcional que será incorporado en el complejo RISC y actuará como un siRNA clásico (Wacheck V. and Zangemeister-Wittke U., 2006). La transfección con dichos plásmidos permite numerosas copias de shRNA y de moléculas de siRNA endógenas (McCaffrey A. P., et al., 2002).

Los micro RNA (miRNA) son RNA no codificadores de 21 a 25 nucleótidos, que controlan la expresión génica a nivel pos-transcripcional. Los miRNA se sintetizan a partir de RNA polimerasa II o RNA polimerasa III en un pre-miRNA de 35 125 nucleótidos. Los pre-miRNA son escindidos en el núcleo por la enzima Droscha, dando lugar a un precursor denominado RNA en horquilla dúplex imperfecto (o RNA en horquilla a base de miRNA). Estos RNA en horquilla dúplex imperfectos son exportados desde el núcleo al citoplasma por la proteína exportina-5, donde son escindidos por la enzima Dicer, dando lugar a miRNA maduros. Los miRNA se combinan con el complejo RISC que permite la reasociación total o parcial con el mRNA monocatenario homólogo diana. La reasociación parcial con el mRNA conduce a la represión de la traducción de proteínas, mientras que la reasociación total conduce a la escisión del 40 mRNA monocatenario (Dykxhoorn D. M., et al., 2003 para revisión).

Por "cadena antisentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de una molécula de siRNA que tiene complementariedad con una región sentido de la molécula de siRNA. Además, la cadena antisentido de una 45 molécula de siRNA comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene homología con una secuencia de ácidos nucleicos diana.

Por "cadena sentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de una molécula de siRNA que tiene complementariedad con una región antisentido de la molécula de siRNA.

Por "modular" y "modulación" se entiende que la expresión génica, o el nivel de molécula de RNA o moléculas de RNA equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más 50 proteínas o subunidades de proteínas es sobre-regulada o sub-regulada, de tal forma que la expresión, nivel o actividad sea mayor o menor que la observada en ausencia del modulador. Dentro del alcance de la invención, la forma preferida de modulación es la inhibición, pero el uso de la palabra "modular" no se limita a esta definición.

Por "inhibir", "silenciar" o "sub-regular" se entiende que los niveles del producto de expresión o el nivel de los RNA o RNA equivalentes que codifican uno o más productos génicos se reducen por debajo de los observados en ausencia 55 de la molécula de ácido nucleico de la invención. En una realización, la inhibición con una molécula de ácido nucleico capaz de mediar la interferencia por RNA (siRNA, shRNA, miRNA) está preferiblemente por debajo del nivel observado en presencia de una molécula inactiva o atenuada que no es capaz de mediar una respuesta de RNAi.

Por "proteína diana" se entiende cualquier proteína cuya expresión o actividad se ha de modular.

Por "ácido nucleico diana" o "gen diana" se entiende cualquier secuencia de ácidos nucleicos cuya expresión o actividad se ha de modular. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo DNA o RNA.

- 5 El ácido nucleico capaz de modular la expresión génica incluye, aunque sin limitación, "ácido nucleico interferente pequeño" (siNA), "RNA interferente pequeño" (siRNA), "molécula de ácido nucleico interferente pequeña", "molécula de oligonucleótido interferente pequeña", "miRNA", "micro RNA" y "RNA pequeño en horquilla" (shRNA), como se ha definido antes.

## 2. Estrategia antisentido.

### a. Estrategia antisentido clásica.

- 10 La estrategia antisentido es una estrategia especial y racional basada en la modificación química con oligonucleótidos y cuya finalidad es la de inhibir específicamente la expresión génica, con oligonucleótidos antisentido (ASON) complementarios de la secuencia de RNA diana, dando como resultado una inhibición de la expresión proteínica. Los ASON son considerados desde 1978 como una nueva clase de fármacos capaces de silenciar específicamente los genes implicados en enfermedades (Gallo M., et al., 2003, Chan J. H., et al., 2006).

- 15 El ASON es un desoxirribonucleótido (DNA) o ribonucleótido (RNA) monocatenario, de 13 a 25, preferiblemente de 15 a 21 bases. La hibridación del ASON en el mRNA diana conduce a la parada de la traducción por bloqueo estérico, a su destrucción por captación de la RNasa H intracelular, cuyo papel es escindir el dúplex DNA/RNA o desestabilizar el pre-mRNA, dando como resultado una inhibición del corte y empalme (Kurreck J., 2003; Chan J.H., et al., 2006).

- 20 b. Nuevas aplicaciones de los oligonucleótidos antisentido.

- En varias aplicaciones recientes, no se utiliza ASON para inhibir una expresión génica, sino por el contrario para restaurar una síntesis normal de proteínas. En los modelos alternativos de corrección del corte y empalme y de salto de exón, el corte y empalme alternativo es anómalo. En general, una mutación atípica situada en un locus del intrón (corrección de corte y empalme) o del exón (salto del exón), es el origen de un corte y empalme anómalo, dando como resultado una proteína no funcional responsable de los síntomas de la enfermedad (Kang S.H., et al., 1998; Sazani P. and Kole R., 2003).
- 25 El ASON es capaz de hibridarse específicamente en el locus de mutación, de una manera dependiente de la secuencia, enmascarar la mutación y reorientar la maquinaria hacia un corte y empalme normal alternativo con la expresión de la proteína funcional.

- 30 Estas aplicaciones tienen un enorme interés en el tratamiento de varios tipos de cáncer, enfermedades neurológicas, tales como la enfermedad de Huntington, la enfermedad macular relacionada con la edad y las enfermedades genéticas, tales como  $\beta$ -talasemia, distrofia muscular de Duchenne (DMD), síndrome de progeria de Hutchinson Gilford (HGFS) o fibrosis quística (CF) para la mutación del CFTR (Mercatante D.R., et al., 2001; Srebrow A and Kornbliht A.R. 2006; Brinkman B.M., 2004, and Venables J.P., 2006).

- 35 c. Modificaciones químicas y nuevas generaciones de oligonucleótidos antisentido.

Se han realizado esfuerzos para modificar la estructura química del ASON, de modo que la RNasa H no pudiera degradar los dúplex de ácidos nucleicos durante la hibridación del ASON en la cadena de RNA: modificaciones estructurales a nivel de la ribosa (2'-fluoro, 2'-metilo, 2'-metoxi), a nivel de las bases y a nivel de la cadena principal (fosfodiéster, fosforotioato).

- 40 Se prefieren los ASON con estructura de la modificación química de la segunda (2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo o MOE) y la tercera (ácido nucleico bloqueado o LNA, ácido péptidonucleico o PNA, fosfordiamidato morfolino o PMO) generación, sin activador de la enzima RNasa H (Altmann K.H., et al., 1996, Egholm M., et al., 1993; Singh S.K., et al., 1998, Summerton J. and Weller D., 1997).

- 45 Los gápmers son oligómeros antisentido quiméricos (mezcla de nucleótidos de RNA y DNA) con un tramo pequeño de DNA de fosforotioato (5-12 nucleótidos). Se han utilizado para obtener la escisión mediada por RNasa H de RNA diana y la degradación del mRNA. Además de la alta potencia de los ASON, mejoran la accesibilidad a las dianas y la resistencia a las nucleasas (Kurreck J., 2003).

Por "oligonucleótido antisentido" se entiende un oligonucleótido monocatenario capaz de hibridación específica con el mRNA (en el citoplasma de la célula) o el pre-mRNA (en el núcleo de la célula).

- 50 El ácido nucleico capaz de mediar el mecanismo antisentido incluye, aunque sin limitación, oligonucleótidos de DNA monocatenario, oligonucleótidos de RNA monocatenario, oligonucleótidos no modificados y modificados químicamente.

### 3. Aptámeros.

5 Los aptámeros son ácidos nucleicos de 20 a 80 nucleótidos, compuestos de DNA, RNA o nucleótidos modificados químicamente (2'-fluoro, 2'-O-metilo o fosforotioato) (Chan J. H., et al., 2006). Gracias a su estructura en 3D, los aptámeros son capaces de unirse a diversas moléculas y proteínas con una alta afinidad, por enlaces de Van der Walls, de hidrógeno y electrostáticos (Pendergrast P. S., et al., 2005).

La aplicación más interesante de los aptámeros parece ser la regulación de la expresión génica por inhibición de la actividad proteínica.

10 Los aptámeros de alta afinidad se pueden obtener por tecnología de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (abreviadamente SELEX, por sus siglas en inglés *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), desarrollada en 1990. Un grupo de oligonucleótidos ( $10^{13}$  a  $10^{15}$  secuencias diferentes) se mezcla con la diana y sólo se seleccionan los unidos a la diana. Estos aptámeros se amplifican a continuación y se utilizan en el siguiente ciclo. Después de 5 a 15 etapas de amplificación, se obtienen aptámeros de alta afinidad (Rimmelle M., 2003; Chauveau F., et al., 2006). Esta técnica está ahora automatizada.

15 Debido a su falta de inmunogenicidad, parece que los aptámeros son buenos candidatos para aplicaciones terapéuticas en enfermedades autoinmunitarias (White R.R., et al., 2000; Kim Y.M., et al., 2003; Drolet D.W., et al., 2000 and Rhodes A., et al., 2000).

Dichos agentes incorporados en el sistema de micelas inversas de acuerdo con la invención pueden atravesar las barreras epiteliales de las mucosas y realizar de este modo su efecto terapéutico en los sitios diana.

20 Los ácidos nucleicos capaces de modular la expresión génica están presentes en el núcleo acuoso de las micelas inversas.

La estabilidad y actividad del agente terapéutico se pueden controlar esencialmente por la concentración de agua en la mezcla.

25 La cantidad de ácido nucleico capaz de modular la expresión génica incorporada en el sistema de micelas inversas se determina por su solubilidad en la fase hidrófila (núcleo acuoso). Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico incluido en el sistema de micelas inversas depende del tamaño del ácido nucleico capaz de modular la expresión génica.

En la presente invención, la concentración en peso del ácido nucleico en la microemulsión se calcula más específicamente con una densidad  $0,94 \pm 0,03$  para la microemulsión.

La densidad se mide generalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica.

### 30 Sistema de micelas inversas y su uso

Las micelas inversas de la invención permiten que el ácido nucleico incluido en ellas sea administrado y transportado a las células con un alto grado de protección, en particular, sin afectar su estabilidad.

35 Actualmente se sabe que un sistema de micelas inversas se puede utilizar para la preparación de los nanomateriales, que actúan como micro-reactores. La actividad y la estabilidad de las biomoléculas se pueden controlar, principalmente por la concentración de agua en el sistema de micelas inversas.

Un objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende micelas inversas como se han definido anteriormente y al menos un vehículo, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

40 De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende de 5 a 20 g de fosfolípido o esfingolípido respecto a 100 g de la composición, y de 5 a 15 g de agua respecto a 100 mL de la composición.

45 De acuerdo con una realización particular, la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, un comprimido oblongo, un aerosol, una pulverización, una solución o una cápsula de gelatina elástica blanda. Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de micelas inversas como se han definido anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica destinada al suministro, más específicamente al suministro a través de las mucosas, de uno o más ácidos nucleicos. La composición farmacéutica está destinada más particularmente a prevenir, tratar y/o mejorar los síntomas de enfermedades genéticas, cánceres, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades infecciosas y/o inflamatorias, enfermedades o trastornos debidos a la proliferación celular.

50 Otro objeto de la invención se refiere a un método para el suministro de uno o más ácidos nucleicos a un mamífero (en particular un ser humano), comprendiendo dicho método administrar al mamífero la composición de micelas inversas que se han definido anteriormente. En una realización específica, la presente invención proporciona un método para el suministro a través de las mucosas de uno o más ácidos nucleicos, comprendiendo dicho método

administrar a través de las mucosas a dicho mamífero (en particular un ser humano) una composición de micelas inversas que se han definido anteriormente.

5 La presente invención proporciona un método para la prevención, tratamiento y/o mejora de los síntomas de una enfermedad genética, cáncer, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad infecciosa e inflamatoria o una enfermedad debida a la proliferación celular, comprendiendo dicho método administrar a dicho a dicho ser humano que lo necesite una cantidad eficaz de una composición de micelas inversas como se han definido anteriormente y que comprende uno o más ácidos nucleicos útiles en la prevención, tratamiento o mejora de los síntomas de la enfermedad genética, cáncer, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad infecciosa e inflamatoria o enfermedad debida a la proliferación celular. En una realización específica, la presente invención proporciona un método para la  
10 prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad o trastorno que se ha definido anteriormente, comprendiendo dicho método administrar a través de las mucosas a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición de micelas inversas que se ha definido anteriormente y que comprende uno o más ácidos nucleicos útiles en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o trastorno.

15 Como excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable se puede utilizar cualquier excipiente, vehículo o portador muy conocido por los expertos en la técnica. También se pueden utilizar otros aditivos muy conocidos por los expertos en la técnica, tales como estabilizadores, agentes colorantes, aglutinantes o tampones de pH. Los excipientes preferidos de acuerdo con la invención promueven la adherencia del producto acabado a las mucosas.

20 La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que se ha descrito anteriormente para el suministro de al menos un ácido nucleico a un mamífero, comprendiendo dicho suministro la administración a través de las mucosas de la composición farmacéutica.

En una realización específica, la composición farmacéutica de la invención se usa para el suministro, más específicamente el suministro a través de las mucosas, de al menos un ácido nucleico.

25 Los ácidos nucleicos en el sistema de micelas inversas formulado de acuerdo con la invención son preferiblemente capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. En consecuencia, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (SNC), en particular de enfermedades genéticas, tumorales, virales y/o degenerativas del SNC.

Las composiciones de la invención se pueden administrar de diferentes modos, en particular por absorción de tejido mucoso, con una absorción bucal, nasal, vaginal o digestiva.

30 El término "sujeto" se refiere a un organismo al que se puede administrar el ácido nucleico de la invención. El sujeto puede ser un animal no humano, preferiblemente un mamífero. El sujeto preferido es un sujeto humano.

35 Como se utiliza en la presente memoria, los términos "mucosa" y "de la mucosa" se refieren a un tejido mucoso tal como un tejido respiratorio, digestivo o genital. "Suministro a través de las mucosas", "administración a través de las mucosas" y términos análogos como se usan en la presente memoria se refieren a la administración de una composición a través de un tejido mucoso. "Suministro a través de las mucosas", "administración a través de las mucosas" y términos análogos incluyen, aunque sin limitación, el suministro de una composición a través del tejido mucoso bronquial, gingival, lingual, nasal, oral, vaginal, rectal y gastrointestinal.

40 En una realización preferida de la invención, la composición de micelas inversas de la invención se administra a través de la mucosa en forma de una cápsula, un comprimido oblongo, un aerosol, una pulverización, una solución o una cápsula de gelatina elástica blanda. Las composiciones de la invención se pueden introducir, por ejemplo, en forma líquida en cápsulas que liberen su contenido en la boca o en cualquier tejido mucoso. Preferiblemente, las composiciones de micelas inversas de la invención se administran a un mamífero, más preferiblemente a un ser humano, para tratar una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad genética, cáncer, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad infecciosa e inflamatoria o una enfermedad debida a la proliferación celular.

45 Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la realización de la presente invención, pero no a limitar su alcance.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** Evaluación del impacto de la proporción de agua incorporada en ausencia de lecitina sobre las curvas de difracción (fig. 1a) y tamaño (fig. 1b) de micelas inversas.

50 **Figura 2:** Evaluación del impacto de la proporción de agua incorporada en presencia de lecitina sobre las curvas de difracción (fig. 2a) y tamaño (fig. 2b) de micelas inversas.

**Figura 3:** Evaluación del impacto del contenido del siRNA de GAPDH incorporado sobre las curvas de difracción de micelas inversas.

**Figura 4:** Biodistribución *in vivo* de siRNA de Alexa 700-CIB1 desnudo (fig. 4a) y siRNA de Alexa 700-CIB1 formulado en micelas inversas (fig. 4b).

**Figura 5:** Evaluación *in vivo* de la inhibición del gen GAPDH del hígado.

**Figura 6:** Evaluación *in vivo* de la inhibición del gen MAFbx del músculo.

5 **Figura 7:** Evaluación *in vivo* de la inhibición de la proteína PCSK9 del hígado.

**Figura 8:** Evaluación *in vivo* de la inhibición de la proteína PrP(C) del cerebro.

### Ejemplos

Los ejemplos 1 y 2 no forman parte de la invención reivindicada, puesto que las micelas inversas ilustradas no comprenden ningún ácido nucleico. Los ejemplos 1 y 2 son útiles para una mejor comprensión de la invención. La muestra 13 del ejemplo 3, la muestra F del ejemplo 5, la muestra I del ejemplo 6 y la muestra 15 del ejemplo 7 no forman parte de la invención reivindicada, son útiles para una mejor comprensión de la invención reivindicada.

#### **Ejemplo 1: Evaluación del impacto de la incorporación de agua sobre la formación y el tamaño de las micelas inversas en ausencia de lecitina**

15 El objeto de este estudio fue evaluar por el método de difracción de rayos X y determinación visual el impacto del contenido de agua sobre la formación de microemulsiones termodinámicamente estables y el tamaño de las micelas inversas dispersadas en ellas.

Se prepararon 10 formulaciones de micelas inversas con diferentes porcentajes de agua de acuerdo con el procedimiento siguiente.

20 Se disolvieron 0,7 g de fitosterol en 1,4 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a 37°C. Se añadió monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C. A esta mezcla oleosa se añadió agua purificada y se agitó entre 300 y 500 r/min durante 60 minutos a 37°C para formar micelas inversas "vacías".

Las diferentes formulaciones se resumen en la siguiente tabla:

Muestra	Contenido de agua (%)	Monooleato de glicerol	Agua
1	1	25,8 g	0,3 g
2	2	25,5 g	0,6 g
3	3	25,2 g	0,9 g
4	4	24,9 g	1,2 g
5	5	24,6 g	1,5 g
6	6	24,3 g	1,8 g
7	7	24,0 g	2,1 g
8	8	23,7 g	2,4 g
9	9	23,4 g	2,7 g
10	10	23,1 g	3,0 g

25 Se prepararon micelas inversas "vacías" aumentando la cantidad de agua de 1% a 10%, con incrementos del 1% (el porcentaje de agua se expresa en peso de agua/volumen total de la composición, densidad 0,94). Para todos estos productos se mantuvieron sin cambios los porcentajes de etanol absoluto (5%) y de fitosterol (2,5%) (peso/peso total de la composición).

30 La formación de microemulsiones termodinámicamente estables se evaluó por la determinación visual de su limpidez.

35 Los parámetros del retículo se obtienen por difracción de rayos X y se supone que corresponden al tamaño de las micelas inversas de la invención. Las muestras se introdujeron en capilares de vidrio de 1,5 mm de diámetro y se utilizó una configuración de transmisión. Se empleó una fuente de rayos X con ánodo giratorio de cobre (que funcionaba a 4 kW) con un monocromador "Osmic" de enfoque de múltiples capas que proporcionaba un flujo alto ( $10^8$  fotones/segundo) y colimación puntual. Se utilizó un detector 2D de "placas de imagen". Se obtuvieron curvas de difracción que daban la intensidad difractada en función del vector de onda  $q$ . La intensidad difractada fue

corregida por los valores del tiempo de exposición, de la transmisión y de la intensidad procedentes de la difusión por un capilar vacío. Los tamaños de las micelas inversas se calcularon con la fórmula:  $d = 2 \pi/q_{max}$  ( $q_{max}$  es el vector de onda correspondiente a la intensidad difractada máxima).

5 En la figura 1a se muestran las curvas de difracción de 10 muestras preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior, demostrando claramente que entre 1% y 6% de agua incorporada, el valor de  $q_{max}$  disminuye cuando aumenta el porcentaje de agua. La figura 1b muestra que entre el 1% y el 6% de agua incorporada el tamaño de las micelas inversas aumenta de 3,1 a 3,7 nm cuando aumenta el porcentaje de agua. Por el contrario, a partir del 7% de agua incorporada deja de aumentar el tamaño de las micelas inversas.

10 Además, el análisis visual muestra que de 1 a 5% de agua incorporada, los productos son límpidos. Desde el 6% de agua, los productos se vuelven cada vez más turbios.

Estos resultados muestran claramente que las formulaciones formadas en ausencia de lecitina son inestables por encima de una cierta cantidad de agua (6%). Muestran además que las micelas formuladas sin lecitina no pueden exceder de un tamaño dado, incluso cuando se aumenta la cantidad de agua en la formulación.

### 15 **Ejemplo 2: Evaluación del impacto de la incorporación de agua sobre la formación y el tamaño de las micelas inversas en presencia de lecitina**

El objeto de este estudio fue evaluar por el método de difracción de rayos X y determinación visual el impacto del contenido de agua sobre la formación de microemulsiones termodinámicamente estables y el tamaño de micelas inversas dispersadas en ellas en presencia de una cantidad creciente de lecitina.

20 Se prepararon 3 formulaciones de micelas inversas con diferentes porcentajes de agua y lecitina de acuerdo con el procedimiento siguiente.

Se disolvió lecitina comercialmente disponible en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,3 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadió monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C para formar una mezcla oleosa. Se añadió agua purificada a la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Las diferentes formulaciones se resumen en la tabla siguiente:

Muestra	Lecitina	Monooleato de glicerol	Agua	Mezcla oleosa
11	0 g (0%)	79,3 g	20,4 mg (4%)	453,9 mg
12	9,4 g (10%)	64,8 g	45,0 mg (9%)	433,8 mg
13	14,1 g (15%)	57,0 g	60,0 mg (12%)	423,3 mg

30 Se prepararon micelas inversas "vacías" variando la cantidad de agua desde 4% (muestra **11**) hasta 12% (muestra **13**) y de lecitina desde 0% (muestra **11**) hasta 15% (muestra **13**). El contenido de lecitina se calcula a partir del peso de lecitina/peso total de la composición y el contenido de agua a partir del peso de agua/volumen total de la composición (densidad 0,94). Para todas estas muestras el porcentaje de fitosterol era 2,5% (peso de fitosterol/peso total de la composición) y el del etanol absoluto era 9% (peso de etanol absoluto/peso total de la composición).

La formación de microemulsiones termodinámicamente estables se evaluó por determinación visual de su limpidez.

35 El tamaño de las micelas inversas de estas formulaciones se evaluó por experimentos de difracción de rayos X como se describe en el ejemplo 1.

En la figura 2a se muestran las curvas de difracción de las muestras **11**, **12** y **13**, que demuestran claramente que aumenta la intensidad difractada y disminuye el valor de  $q_{max}$  cuando aumenta el porcentaje de lecitina de 0 a 15%. La figura 2b muestra que el tamaño de las micelas inversas aumenta desde 3,1 hasta 4,5 nm cuando aumenta el porcentaje de lecitina de 0 a 15%. El análisis visual muestra que estas formulaciones son límpidas.

40 En consecuencia, estos experimentos muestran que la adición de 15% de lecitina permite la formación de microemulsiones termodinámicamente estables con un tamaño de micelas inversas de 4,5 nm y altos porcentajes de agua (12%). Por tanto la adición de lecitina soluciona los inconvenientes de las micelas inversas formuladas en ausencia de lecitina descritos en el ejemplo 1.

**Ejemplo 3: Evaluación del impacto de la incorporación del siRNA de GAPDH sobre la formación y tamaño de las micelas inversas**

5 El objeto de este estudio fue evaluar por el método de difracción de rayos X y determinación visual el impacto del contenido del siRNA de GAPDH sobre la formación de microemulsiones termodinámicamente estables y el tamaño de micelas inversas dispersadas en ellas en presencia de lecitina.

El siRNA de GAPDH es un siRNA bicatenario que comprende 21 nucleótidos y está diseñado para permitir el silenciamiento del gen GAPDH.

Se prepararon 4 formulaciones de micelas inversas con diferentes concentraciones del siRNA de GAPDH de acuerdo con el procedimiento siguiente.

10 Se añadió una solución de siRNA que contenía siRNA de GAPDH a la mezcla oleosa preparada de acuerdo con la muestra **13** y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían siRNA de GAPDH.

Las diferentes formulaciones se resumen en la tabla siguiente:

Muestra	Solución de siRNA o agua	siRNA de GAPDH	Mezcla oleosa	Concentración de GAPDH
A	59,6 mg	150 µg	411,3 mg	300 µg/mL
B	60,9 mg	228 µg	414,8 mg	450 µg/mL
C	61,1 mg	303 µg	414,5 mg	600 µg/mL
D	59,9 mg	479 µg	413,2 mg	950 µg/mL
13	60,0 mg	0 µg	423,3 mg	0 µg/mL

15 Se prepararon micelas inversas aumentando las concentraciones del siRNA de GAPDH desde 0 (muestra **13**) hasta 950 µg/mL (muestra **D**). Para todas estas muestras el porcentaje de fitosterol era 2,5% (peso de fitosterol/peso total de la composición), el de etanol absoluto era 9% (peso de etanol absoluto/peso total de la composición), el de agua era 12% (peso de agua/volumen total de la composición, densidad 0,94) y el de lecitina era 15% (peso de lecitina/peso total de la composición).

La formación de microemulsiones termodinámicamente estables se evaluó por determinación visual de su limpidez.

El tamaño de las micelas inversas de estas formulaciones se evaluó por experimentos de difracción de rayos X como se describe en el ejemplo 1.

25 La figura 3 muestra las curvas de difracción de las muestras **13, A, B, C** y **D**. El valor de  $q_{max}$  es el mismo para todas las muestras, a pesar de un aumento de la concentración del siRNA de GAPDH. El tamaño de las micelas inversas se calcula en 4,5 nm para todas estas muestras. El análisis visual muestra que estas formulaciones son límpidas.

Estos experimentos muestran que la adición del siRNA de GAPDH no perturba la formación de microemulsiones termodinámicamente estables ni cambia el tamaño de las micelas inversas dispersadas en ellas.

**30 Ejemplo 4: Evaluación de la biodistribución *in vivo* de siRNA de Alexa 700-ciclina B1 (CIB1) fluorescente formulado en micelas inversas**

35 El objeto de este estudio fue evaluar por técnica de formación de imágenes de animales la biodistribución de siRNA de Alexa 700-CIB1 formulado en micelas inversas de acuerdo con el siguiente procedimiento (muestra **E**) cuando se suministra por vía rectal en comparación con la misma dosis de dicho siRNA no formulado en solución suministrado por vía intravenosa.

El siRNA de Alexa 700-CIB1 es un siRNA bicatenario que comprende 21 nucleótidos y está diseñado para ser fluorescente.

**Muestra E:** se disolvieron 14,1 g de lecitina en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,3 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron 57,0 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C. Se añadieron 48 mg de una solución de siRNA que contenía 100 µg de siRNA de Alexa 700-CIB1 a 328,7 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética a 700 r/min durante 45 minutos para formar micelas inversas que contenían 250 µg de siRNA de Alexa 700-CIB1/mL (densidad 0,94).

Productos administrados:

- **Muestra E:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 250 µg de siRNA de Alexa 700-CIB1/mL, suministradas a 2 mL/kg por vía rectal.

- siRNA de Alexa 700-CIB1 no formulado: siRNA desnudo en solución con 50 µg de siRNA de Alexa 700-CIB1/mL, suministrado a 10 mL/kg por vía intravenosa.

siRNA de Alexa 700-CIB1 desnudo no formulado o micelas inversas formuladas con dicho siRNA se administraron una vez a 500 µg/kg (10 µg) a ratones atímicos anestesiados. La solución de siRNA de Alexa 700-CIB1 desnudo se administró por vía intravenosa en la vena de la cola y las micelas inversas formuladas con siRNA se administraron lentamente con una pipeta al recto inferior, inmediatamente después del esfínter anal.

Los ratones se colocaron bajo la cámara a 660 nm y se tomaron imágenes laterales ventrales a 0, 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 5 h y 24 h para visualizar la biodistribución de la intensidad de fluorescencia.

Los resultados se muestran en las figuras 4a y 4b. La figura 4a muestra una rápida absorción de siRNA desnudo después de inyección intravenosa. La máxima intensidad de fluorescencia se observó 15 minutos después de la administración y disminuyó rápidamente.

Por el contrario, la figura 4b muestra que siRNA formulado en micelas inversas y administrado por vía rectal, se distribuye ampliamente en todo el cuerpo del animal con un pico de fluorescencia alrededor de 4 horas y una eliminación muy lenta.

El experimento anterior demuestra que siRNA formulado en micelas inversas se puede suministrar *in vivo* y que la formulación en micelas inversas aumenta mucho la protección del siRNA y la vida útil.

#### **Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia *in vivo* del siRNA de GAPDH formulado en formulaciones de micelas inversas para inhibir la expresión del gen GAPDH**

El objeto de este estudio fue evaluar la eficacia del silenciamiento del gen GAPDH en el hígado del siRNA de GAPDH formulado en micelas inversas preparadas de acuerdo con los procedimientos indicados a continuación (muestras **F** y **G**) cuando se suministran por vía rectal a ratones C57B1/6J.

El siRNA de GAPDH es un siRNA bicatenario que comprende 21 nucleótidos y está diseñado para permitir el silenciamiento del gen GAPDH.

**Muestra F:** se disolvieron 2,3 g de colesterol en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 79,2 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C para formar una mezcla oleosa. Se añadieron 40,0 mg de una solución de siRNA que contenía 301 µg de siRNA de GAPDH a 904,0 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 300 µg de siRNA de GAPDH/mL (densidad 0,94).

**Muestra G:** se disolvieron 6,6 g de lecitina en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,3 g de colesterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron 67,7 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C. Se añadieron 45,2 mg de una solución de siRNA que contenía 286 µg del siRNA de GAPDH a 852,7 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 300 µg del siRNA de GAPDH/mL (densidad 0,94).

**Muestra 14:** se añadieron 40,5 mg de agua purificada a 900,6 mg de la mezcla oleosa preparada de acuerdo con la muestra **F** y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Productos administrados:

- **Muestra F:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 300 µg del siRNA de GAPDH/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 3 días

- **Muestra G:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 300 µg del siRNA de GAPDH/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 3 días

- **Muestra 14:** micelas inversas "vacías" preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 3 días

5 Como se describe en la tabla siguiente, ambas formulaciones de micelas inversas que contienen siRNA de GAPDH se suministraron a 600 µg/kg (300 µg/kg dos veces al día) durante 3 días a ratones C57B1/6J (grupos 2 y 3, de 3 ratones por grupo). Estos productos se suministraron lentamente con una pipeta en el recto inferior, inmediatamente después del esfínter anal. Los ratones no tratados o tratados con micelas inversas "vacías" se utilizaron como controles (grupos 1 y 4) (muestra 14).

10 Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la última administración. A continuación se extrajeron los hígados y se congelaron. El RNA total se extrajo por el método de TRIzol<sup>®</sup>/cloroformo y la expresión del mRNA de GAPDH se evaluó por RT-PCR cuantitativa, con relación a un gen normalizador (ubiquitina).

15 Los resultados se muestran en la figura 5 que demuestra la eficacia *in vivo* del siRNA de GAPDH formulado en micelas inversas que contienen colesterol (muestra F) para reducir la expresión del gen GAPDH del hígado. La adición de lecitina en la muestra G muestra una eficacia similar para reducir la expresión del gen GAPDH. Por el contrario, las micelas inversas "vacías" (muestra 14) son ineficaces en la disminución de la expresión del gen GAPDH. Las micelas inversas de acuerdo con la invención son por lo tanto tan eficaces como las que no contienen lecitina para el suministro de dichas cantidades de ácidos nucleicos. Además, permiten el suministro de mayores cantidades de ácidos nucleicos que las micelas inversas sin lecitina.

Grupos	Número de animales	Tratamiento	Dosis suministrada (µg/kg/d)	Volumen suministrado (mL/kg/d)
1	3	Sin tratamiento	0	-
2	3	Muestra F	600	2x 1
3	3	Muestra G	600	2x 1
4	3	Muestra 14	0	2x 1

20 **Ejemplo 6: Evaluación de la eficacia *in vivo* del siRNA de la ubiquitina ligasa atrogina 1/secuencia de la atrofia muscular F-box (abreviadamente MAFbx, por la expresión inglesa *Muscle Atrophy F-box*) formulado en micelas inversas para inhibir la expresión del gen MAFbx**

25 El objeto de este estudio fue evaluar la eficacia del silenciamiento del gen MAFbx del siRNA si1 o si2 de MAFbx formulado en micelas inversas de acuerdo con los siguientes procedimientos (muestras H e I) cuando se suministran por vía rectal en comparación con la misma dosificación del siRNA si1 de MAFbx no formulado suministrado por vía intravenosa, en un modelo de ratones inducidos de sobreexpresión de MAFbx.

Los siRNA si1 y si2 de MAFbx son siRNA bicatenarios que comprenden, respectivamente, 19 y 21 nucleótidos y están diseñado para permitir el silenciamiento del gen MAFbx.

30 **Muestra H:** se disolvieron 14,1 g de lecitina en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,3 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron 57,0 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C. Se añadieron 117,3 mg de una solución de siRNA que contenía 303 µg del siRNA s1 de MAFbx a 833,8 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 300 µg del siRNA si1 de MAFbx/mL (densidad 0,94).

35 **Muestra I:** se disolvieron 2,3 g de fitosterol en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 79,2 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C para formar una mezcla oleosa. Se añadieron 39,5 mg de una solución de siRNA que contenía 302 µg del siRNA si2 de MAFbx a 905,4 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 300 µg del siRNA si2 de MAFbx/mL (densidad 0,94).

40 Productos administrados:

- **Muestra H:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 300 µg de siRNA si1 de MAFbx/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal los días 1 y 2

- **Muestra I:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 300 µg de siRNA si2 de MAFbx/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal los días 1 y 2

5 - siRNA si1 de MAFbx no formulado: siRNA desnudo en solución a 300 µg/mL, suministrado a 1 mL/kg por vía intravenosa el día 1 y a 150 µg/mL suministrado a 1 mL/kg el segundo día.

Se trataron ratones B6CBA F1 como se describe en la tabla siguiente. Se suministraron micelas inversas formuladas con siRNA si1 o 2 de MAFbx (muestras H e I) a 300 µg/kg por vía rectal una vez al día durante 2 días. Estos productos se suministraron lentamente con una pipeta en el recto inferior, inmediatamente después del esfínter anal.  
 10 Después de este tratamiento, se les privó de alimento durante 2 días para inducir la atrofia muscular esquelética y la sobreexpresión de MAFbx (grupos 5 y 7, de 8 ratones por grupo). A los ratones se les administró el mismo tratamiento (muestras H e I) pero a los que no se les privó de alimento se utilizaron como controles (grupos 4 y 6, de 4 ratones por grupo). Otro grupo de 8 ratones (grupo 3) se trató con siRNA si1 de MAFbx desnudo no formulado por vía intravenosa en la vena de la cola a 300 µg/kg el primer día y a 150 µg/kg el segundo día seguido de una  
 15 privación de alimento durante 2 días. Se utilizaron como controles (grupos 1 y 2, de 8 ratones por grupo) ratones no tratados privados o no de alimento.

Todos los ratones se sacrificaron el día 5 y los músculos *Tibialis anterior* (TA) se extrajeron y congelaron. El RNA total se extrajo por el método TRIzol®/cloroformo y se evaluó la expresión del mRNA de MAFbx con relación al gen ribosomal normalizador (RPS9) por RT-PCR cuantitativa usando el sistema *mini Opticon Real Time PCR* (BioRad).

20 Los resultados de la PCR cuantitativa se muestran en la figura 6, que demuestra claramente la eficacia de las micelas inversas formuladas con siRNA de MAFbx para reducir la sobreexpresión del gen MAFbx. Se observa una reducción de alrededor del 90% en los niveles del mRNA de MAFbx en los animales tratados con las muestras H e I en comparación con los animales sin tratar. Por tanto las micelas inversas de acuerdo con la invención son tan eficaces como las que no contienen lecitina para el suministro de dichas cantidades de ácidos nucleicos.  
 25 Adicionalmente permiten el suministro de mayores cantidades de ácidos nucleicos que las micelas inversas sin lecitina.

Grupos	Número de animales	Tipo de animal	Tratamiento	Compuestos activos	Dosis suministrada (µg/kg/d)	Volumen suministrado (mL/kg/d)
1	8	Sin privación de alimento	Sin tratamiento	-	0	-
2	8	Privación de alimento	Sin tratamiento	-	0	-
3	8	Privación de alimento	siRNA desnudo	siRNA si1 de MAFbx	300 y 150	1
4	4	Sin privación de alimento	Muestra H	siRNA si1 de MAFbx	300	1
5	8	Privación de alimento	Muestra H	siRNA si1 de MAFbx	300	1
6	4	Sin privación de alimento	Muestra I	siRNA si2 de MAFbx	300	1
7	8	Privación de alimento	Muestra I	siRNA si2 de MAFbx	300	1

**Ejemplo 7: Evaluación de la eficacia *in vivo* del siRNA dirigido al siRNA de la proproteína convertasa-subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) formulado en micelas inversas para inhibir la expresión de la proteína PCSK9**

30

El objeto de este estudio fue evaluar la eficacia del siRNA de PCSK9 formulado en micelas inversas de acuerdo con el procedimiento siguiente (muestra J) para disminuir la expresión de la proteína PCSK9 cuando se suministra por vía rectal en comparación con la misma dosificación del siRNA de PCSK9 no formulado suministrado por vía intravenosa a ratones C57B1/6J.

- 5 El siRNA de PCSK-9 es un siRNA bicatenario que comprende 21 nucleótidos y está diseñado para permitir la inhibición de la expresión de la proteína PCSK9.

10 **Muestra J:** se disolvieron 14,3 g de lecitina en 8,6 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,4 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron 57,8 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 60 minutos a 37°C. Se añadieron 694,8 mg de una solución de siRNA que contenía 5797 µg de siRNA de PCSK9 a 4819,4 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 1000 µg de siRNA de PCSK9/mL (densidad 0,95).

15 **Muestra 15:** se añadió 2,4 g de agua purificada a 16,6 g de la mezcla oleosa preparada de acuerdo con la muestra J y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas "vacías".

Productos administrados:

- **Muestra J:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior en 1000 µg de siRNA de PCSK9/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 10 días
- **Muestra 15:** micelas inversas "vacías", suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 10 días
- 20 - siRNA de PCSK9: siRNA desnudo en solución a 1000 µg/mL de siRNA de PCSK9, suministrado a 1 mL/kg por vía intravenosa durante 10 días
- tampón de solución salina suministrado a 1 mL/kg por vía intravenosa durante 10 días

25 Ratones C57B1/6J (7 u 8 ratones por grupo) se trataron como se describe en la tabla siguiente. El siRNA de PCSK9 formulado en la muestra J suministrado a 1000 µg/kg (grupo 1) y micelas inversas "vacías" (muestra 15), utilizado como control (grupo 2), se administraron por vía rectal una vez al día durante 10 días. Estos productos se suministraron lentamente con una pipeta en el recto inferior, inmediatamente después del esfínter anal. También se utilizaron como controles animales tratados por vía intravenosa durante 10 días con siRNA de PCSK9 desnudo sin formular (grupo 3) o tampón de solución salina (grupo 4).

30 Todos los ratones se sacrificaron el día 11. Los hígados se extrajeron y congelaron. La expresión de la proteína PCSK9 se determinó por un método ELISA (R & D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 Los resultados se muestran en la figura 7 y demuestran claramente la eficacia del tratamiento con micelas inversas formuladas con siRNA de PCSK9 (muestra J) para reducir la expresión de la proteína PCSK9 en el hígado en comparación con micelas inversas vacías (muestra 15). Además, la formulación del siRNA de PCSK9 en micelas inversas de acuerdo con la invención permite una mejor eficacia de dicho siRNA para reducir la expresión de la proteína PCSK9 en el hígado en comparación con el siRNA de PCSK9 desnudo.

Grupos	Número de animales	Tratamiento	Dosis suministrada (µg/kg/d)	Volumen suministrado (mL/kg/d)
1	8	Muestra J	1000	1
2	8	Muestra 15	0	1
3	7	siRNA desnudo	1000	1
4	7	Tampón de solución salina	0	1

**Ejemplo 8: Evaluación de la eficacia *in vivo* del siRNA de PrP(C) formulado en micelas inversas para inhibir la expresión de la proteína PrP(C)**

40 El objeto de este estudio fue evaluar la eficacia del siRNA de la proteína priónica normal, PrP(C), formulado en micelas inversas de acuerdo con el siguiente procedimiento (muestra K) cuando se suministra por vía rectal para inhibir la expresión de la proteína PrP(C) en el cerebro de ratones C57B1/6J.

El siRNA de PrP(C) es un siRNA bicatenario que comprende 21 nucleótidos y está diseñado para permitir la inhibición de la expresión de la proteína PrP(C).

5 **Muestra K:** se disolvieron 14,1 g de lecitina en 8,5 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,3 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron 57,1 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 45 minutos a 37°C. Se añadieron 184,0 mg de una solución de siRNA que contenía 932 µg del siRNA de PrP(C) a 1233,6 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 60 minutos para formar micelas inversas que contenían 618 µg de siRNA de PrP(C)/mL (densidad 0,94).

10 El siRNA desordenado (abreviadamente SC, por la palabra inglesa *scrambled*) es un siRNA bicatenario que comprende 21 nucleótidos y está diseñado para no permitir ninguna modulación de la expresión de la proteína PrP(C).

15 **Muestra L:** se añadieron 184,2 mg de una solución de siRNA que contenía 933 µg de siRNA SC a 1233,8 mg de la mezcla oleosa preparada de acuerdo con la muestra **K** y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 60 minutos para formar micelas inversas que contenían 618 µg de siRNA SC/mL (densidad 0,94).

Productos administrados:

- **Muestra K:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 618 µg de siRNA de PrP(C)/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 12 días

20 - **Muestra L:** micelas inversas preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior con 618 µg de siRNA SC/mL, suministradas a 1 mL/kg por vía rectal durante 12 días

25 Ratonos C57B1/6J se trataron como se describe en la siguiente tabla. Los siRNA de PrP(C) y SC formulados en micelas inversas (muestras **K** y **L**) se suministraron a 618 µg/kg (grupos 2 y 3, de 10 ratones por grupo). Ambos productos se suministraron lentamente con una pipeta en el recto inferior, inmediatamente después del esfínter anal una vez al día durante 12 días (fin de semana excluidos). Los animales no tratados también se utilizaron como controles (grupo 1, de 10 ratones por grupo).

Todos los ratones se sacrificaron el día 13. Los cerebros se extrajeron y congelaron. Los niveles de la proteína PrP(C) se determinaron por un método ELISA (SPI BIO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 Los resultados se muestran en la figura 8 que demuestra claramente la eficacia del siRNA de PrP(C) formulado en micelas inversas (muestra **K**) para atravesar la barrera hematoencefálica y reducir la expresión de la proteína del cerebro PrP(C). En contraste, las micelas inversas formuladas con un siRNA desordenado no específico (muestra L) no tienen ningún efecto sobre la expresión en el cerebro de PrP(C).

Grupos	Número de animales	Tratamiento	Compuestos activos	Dosis suministrada (µg/kg/d)	Volumen suministrado (mL/kg/d)
1	10	Sin tratamiento	-	0	-
2	10	Muestra L	siRNA desordenado	618	1
3	10	Muestra K	siRNA de PrP(C)	618	1

#### Ejemplo 9: Formulación de micelas inversas de acuerdo con la invención con oligonucleótidos antisentido

35 El objeto de este estudio fue formular oligonucleótidos antisentido (ASON) químicamente modificados en micelas inversas de acuerdo con la invención.

DMPK2467U es un ASON gápmero que comprende 20 nucleótidos.

40 **Muestra M:** se disolvieron 14,3 g de lecitina en 8,6 g de etanol absoluto con agitación magnética a 300 r/min durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,4 g de fitosterol y se agitó en las mismas condiciones. Se añadieron 57,8 g de monooleato de glicerol y se realizó una agitación magnética a 500 r/min durante 60 minutos a 37°C. Se añadieron 724,6 mg de una solución de ASON que contenía 5973 µg del ASON DMPK2467U

a 4984,0 mg de la mezcla oleosa y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 994 µg del ASON DMPK2467U/mL (densidad 0,95).

DMPKGD65 es un ASON gápmero que comprende 20 nucleótidos.

- 5 **Muestra N:** se añadieron 715,6 mg de una solución de ASON que contenía 5933 µg del ASON DMPKGD65 a 4986,2 mg de la mezcla oleosa preparada de acuerdo con la muestra **M** y se agitó a temperatura ambiente con agitación magnética entre 300 y 500 r/min durante 30 minutos para formar micelas inversas que contenían 988 µg del ASON DMPKGD65/mL (densidad 0,95).

#### Referencias

Altmann K. H., Fabbro D., Dean N. M., Geiger T., Monia B. P., Muller M. y Nicklin P. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24(3):630-7.

Brinkman B. M. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*, 2004, 37(7):584-94.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., y Agami, R. (2002); a system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553

Chan J. H., Lim S. y Wong W. S. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(5-6):533-40.

Chauveau F., Pestourie C. y Tavitian B. [Aptamers: selection and scope of applications]. *Pathol Biol (Paris)*, 2006, **54**(4):251-8.

Drolet D. W., Nelson J., Tucker C. E., Zack P. M., Nixon K., Bolin R., Judkins M. B.,

Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp Philip A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 457-467

Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S. M., Driver D. A., Berg R. H., Kim S. K., Norden B. y Nielsen P. E. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 1993, **365**(6446):566-8.

Gallo M., Montserrat J. M. y Iribarren A. M. Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz J Med Biol Res*, 2003, **36**(2):143-51.

Kang S. H., Cho M. J. y Kole R. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry*, 1998, **37**(18):6235-9.

Kim Y. M., Choi K. H., Jang Y. J., Yu J. y Jeong S. Specific modulation of the anti-DNA autoantibody-nucleic acids interaction by the high affinity RNA aptamer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300**(2):516-23.

Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(8):1628-44.

McCaffrey A. P., Meuse L., Pham T. T., Conklin D. S., Hannon G. J. y Kay M. A. RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, **418**(6893):38-9.

Mercatante D. R., Bortner C. D., Cidlowski J. A. y Kole R. Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *J Biol Chem*, 2001, **276**(19):16411-7.

Pendergrast P. S., Marsh H. N., Grate D., Healy J. M. y Stanton M. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *J Biomol Tech*, 2005, **16**(3):224-34.

Rhodes A., Deakin A., Spaul J., Coomber B., Aitken A., Life P. y Rees S. The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M. *J Biol Chem*, 2000, **275**(37):28555-61.

Rimmele M. Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *Chembiochem*, 2003, **4**(10):963-71.

Sazani P. y Kole R. Modulation of alternative splicing by antisense oligonucleotides. *Prog Mol Subcell Biol*, 2003, **31**(217-39).

Singh S. K., Kumar R. y Wengel J. Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides. *J Org Chem*, 1998, **63**(18):6078-6079.

Srebrow A. y Kornbliht A. R. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci*, 2006, **119**(Pt 13):2635-41.

Summerton J. y Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997, **7**(3):187-95.

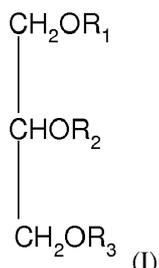
Venables J. P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays*, 2006, **28**(4):378-86.

Wacheck V. y Zangemeister-Wittke U. Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, **59**(1):65-73.

White R. R., Sullenger B. A. y Rusconi C. P. Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest*, 2000, **106**(8):929-34.

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema de micelas inversas que comprende al menos un ácido nucleico, un esteroles, un acilglicerol, un fosfolípido o un esfingolípido, un alcohol y agua, en donde la relación en peso fosfolípido o esfingolípido/acilglicerol es de 0,05 a 0,40.
- 5 2. El sistema de micelas inversas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las micelas presentan núcleos acuosos de 4 nm, preferiblemente de 3 a 5 nm, más preferiblemente de 3,5 a 5 nm, en particular de 3,7 a 4,5 nm.
3. El sistema de micelas inversas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, obtenible por el método siguiente:
- (a) poner en contacto (i) esteroles, (ii) acilglicerol, (iii) fosfolípido o esfingolípido, (iv) alcohol, (v) agua y (vi) al menos un ácido nucleico,
- 10 (b) agitar la mezcla obtenida en la etapa (a), a 40°C o menos, y durante un tiempo suficiente para obtener la formación de micelas inversas.
4. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación en peso esteroles/acilglicerol varía de 0,015 a 0,05, más particularmente de 0,03 a 0,04.
- 15 5. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en donde la agitación de la etapa (b) se realiza a una temperatura que varía de 15°C a 40°C, o de 25°C a 40°C, o más específicamente de 30°C a 37°C.
6. El sistema de micelas inversas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fosfolípido es fosfatidilcolina.
- 20 7. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el acilglicerol presenta la siguiente fórmula (I):



en donde:

- R<sub>1</sub> es un residuo acilo de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, un átomo de hidrógeno, o una mono-, di- o tri-galactosa o glucosa;
- 25 - R<sub>2</sub> es un residuo acilo de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, que tiene entre 2 y 18 átomos de carbono;
- R<sub>3</sub> es un residuo acilo de un ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado, que tiene entre 14 y 24 átomos de carbono, o un átomo de hidrógeno.
- 30 8. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el acilglicerol se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dioleína y 1-oleoil-2-acetil-glicerol.
9. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el esteroles es sitosterol o colesterol.
10. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido capaz de interactuar con mRNA, pre-mRNA o una proteína y capaz de modular la expresión génica.
- 35 11. El sistema de micelas inversas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico es un oligonucleótido capaz de sobre-regular o sub-regular la expresión de la(s) proteína(s) diana.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende un sistema de micelas inversas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y al menos un vehículo, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación anterior, para el suministro a un mamífero de al menos un ácido nucleico, comprendiendo dicho suministro la administración a través de las mucosas de la composición farmacéutica.
- 5 14. La composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 ó 13 anteriores para la prevención, tratamiento y/o mejora de los síntomas de enfermedades genéticas, cánceres, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades infecciosas y/o inflamatorias, o enfermedades o trastornos debidos a la proliferación celular.
- 10 15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde los ácidos nucleicos de el sistema de micelas inversas atraviesan la barrera hematoencefálica, y en donde la enfermedad o trastorno se selecciona más particularmente de enfermedades genéticas, tumorales, virales y degenerativas del sistema nervioso central.

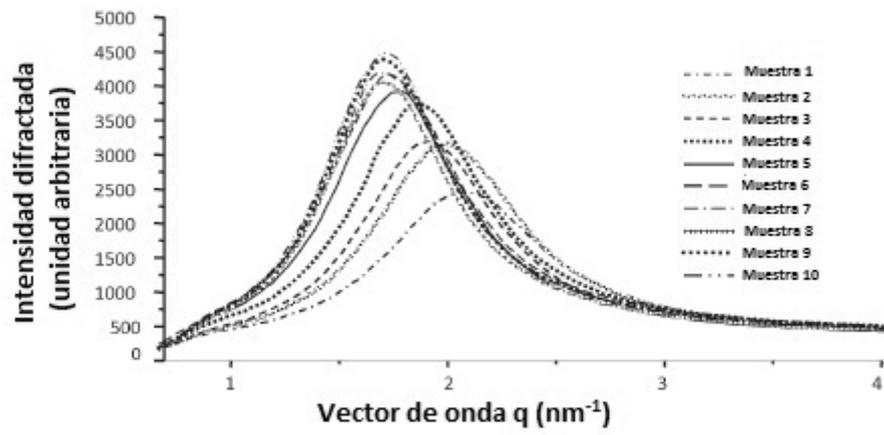


FIGURA 1a

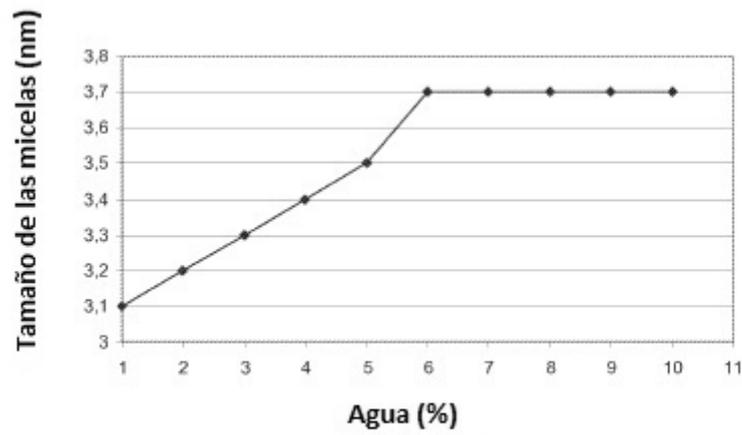


FIGURA 1b

FIGURA 1

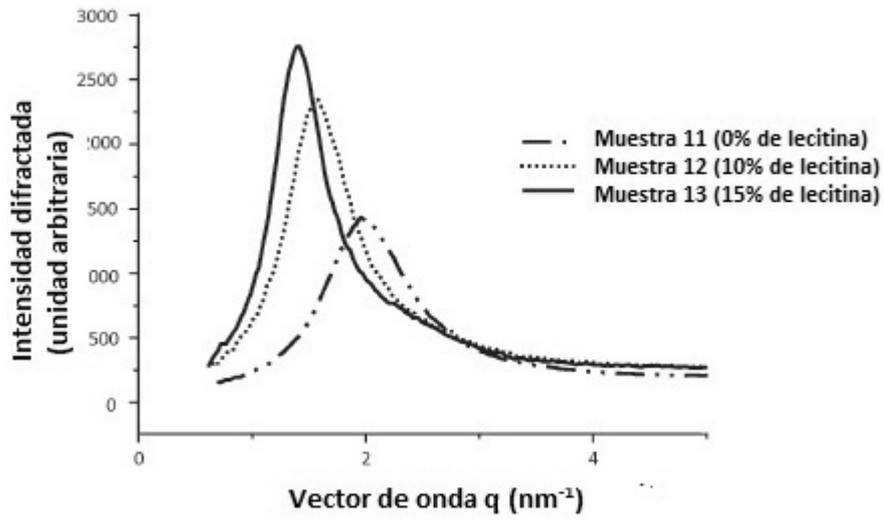


FIGURA 2a

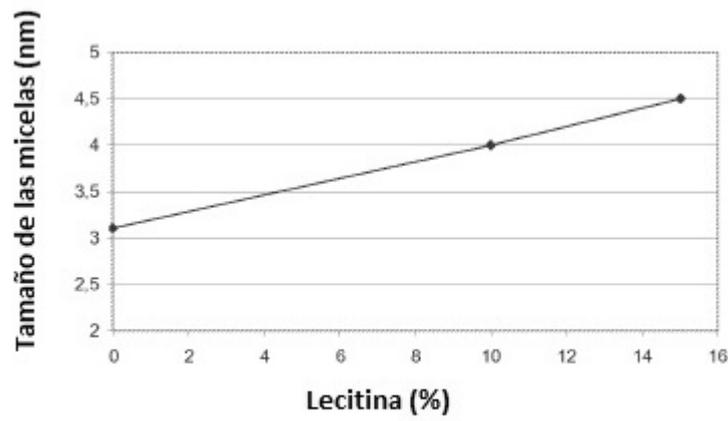
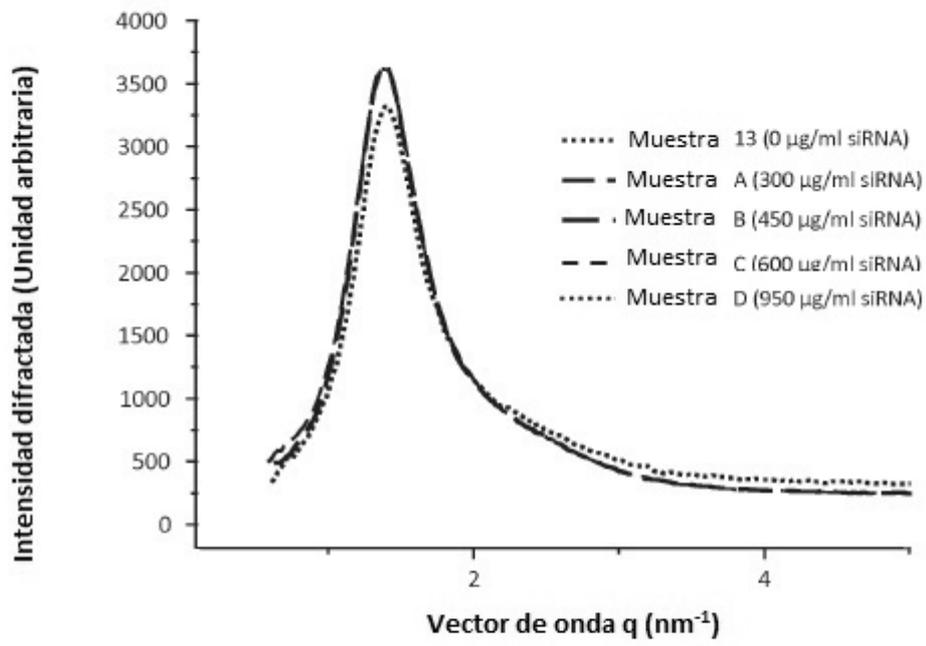


FIGURA 2b

FIGURA 2



**FIGURA 3**

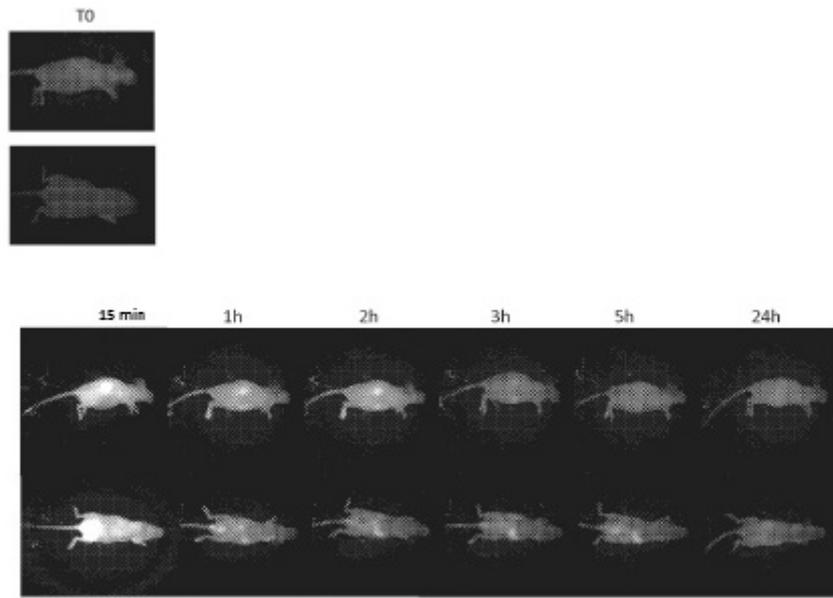


FIGURA 4a

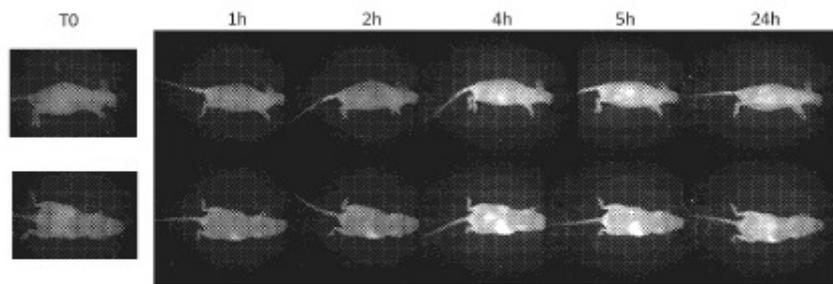


FIGURA 4b

**FIGURA 4**

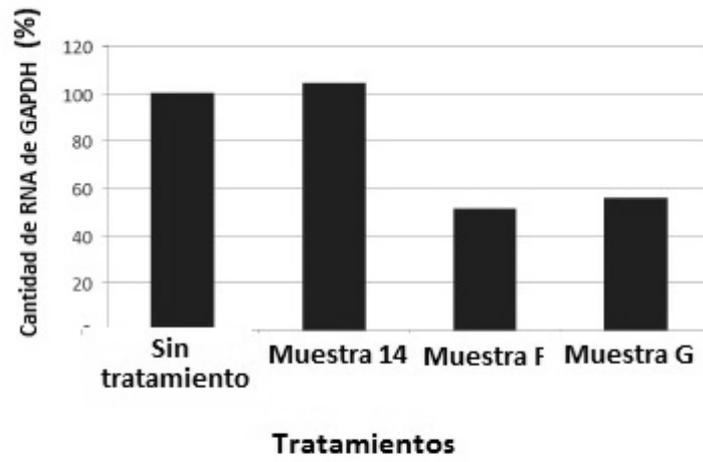


FIGURA 5

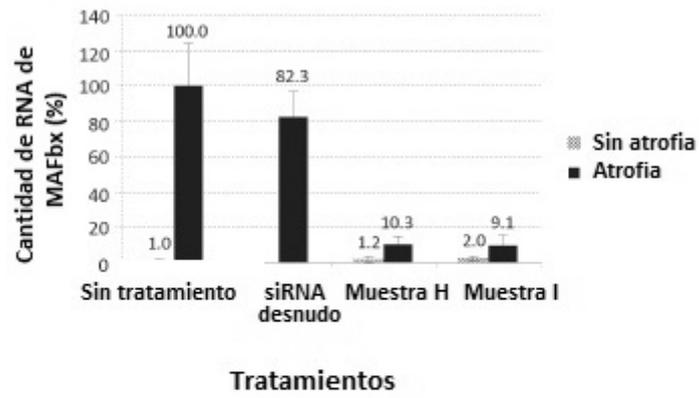
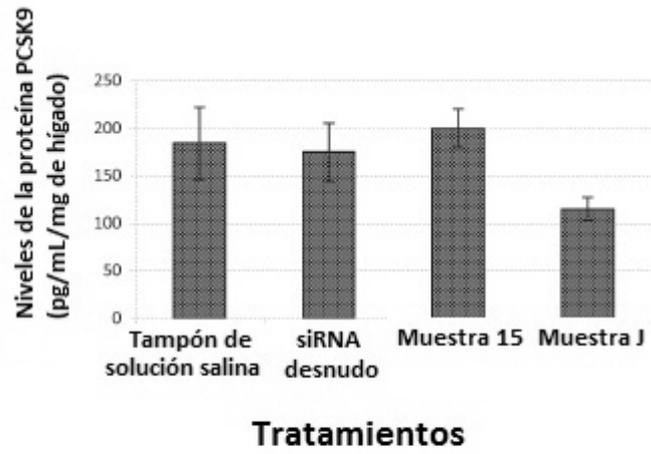


FIGURA 6



**FIGURA 7**

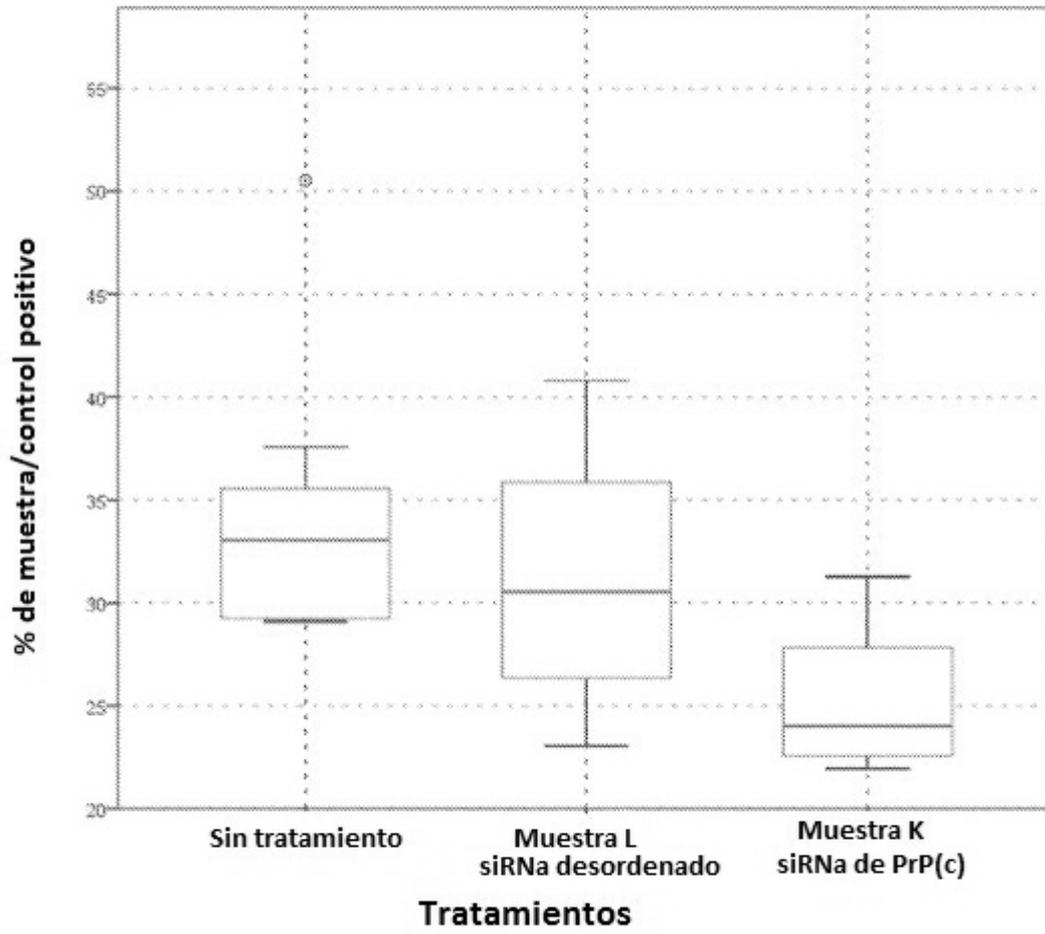


FIGURA 8