

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 906**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2008 PCT/US2008/065329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008 WO08151022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08756527 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2162117**

54 Título: **Nanopartículas de ácido nucleico y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**31.05.2007 US 941187 P**

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

**26.03.2018**

73 Titular/es:

**ANTERIOS, INC. (100.0%)  
5 Giralda Farms  
Madison, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:

**EDELSON, JONATHAN;  
KOTYLA, TIMOTHY y  
ZHANG, BOKE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 660 906 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de ácido nucleico y usos de las mismas

5 Antecedentes de la invención

Se ha mostrado que los ácidos nucleicos tienen efectos cosméticos y terapéuticos beneficiosos sobre la piel. En modelos experimentales, se ha mostrado que los ácidos nucleicos tales como ADNc que codifica el factor de crecimiento de queratinocitos 1 (KGF-1) mejoran la curación de heridas (Lin *et al.*, 2006, *Wound Repair Regen.*, 14: 618). De forma similar, se ha mostrado que los ácidos nucleicos que codifican el interferón gamma estimulan la producción de interferón que inhibe la síntesis de colágeno en la piel y tienen el potencial de tratar escleroderma, una enfermedad del tejido conectivo (Badea *et al.*, 2005, *J Gene Med.*, 7: 1200). En modelos experimentales, se ha mostrado que siARN orientados a genes que codifican la producción de queratina en la piel inhiben estos genes y tienen el potencial de usarse para tratar el trastorno cutáneo paquioniquia congénita (Hickerson *et al.*, 2006, *Ann. N.Y Acad. Sci.*, 1082: 56). Son documentos adicionales de la técnica anterior WO98/51278 A2 y US 6.835.395 B1.

Sin embargo, ha sido un problema para conseguir los efectos cosméticos y terapéuticos potenciales de estos ácidos nucleicos en seres humanos el suministro transdérmico de estas moléculas a través de la capa externa de la piel (es decir, estrato córneo) al sitio de acción biológica, tal como epidermis y dermis, tejido subyacente más profundo y/o sitios remotos en el cuerpo (Choi *et al.*, en: *Percutaneous Absorption*, 4ª Ed., Bronaugh y Maibach, ed., Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2005). El estrato córneo es una barrera física efectiva que previene la penetración transdérmica de moléculas tales como ácidos nucleicos. Las enzimas cutáneas pueden actuar también destruyendo los ácidos nucleicos mediante degradación enzimática (Choi *et al.*, *supra*).

Se han hecho intentos por modificar químicamente ácidos nucleicos para prevenir tal degradación, pero tal modificación deteriora típicamente la actividad biológica del agente y/o induce reacciones desfavorables del sistema inmunitario. Las modificaciones químicas son también desventajosas porque son caras y consumen tiempo.

Se han usado algunos procedimientos para intentar mejorar la penetración transdérmica de ácidos nucleicos, incluyendo extracción con cinta adhesiva de la capa externa de la piel, electroporación o iontoforesis de la piel, el uso de formulaciones semisólidas (p.ej., cremas, etc.), potenciadores de la penetración química que degradan el estrato córneo y/o liposomas no iónicos (Choi *et al.*, *supra*). Cada uno de los procedimientos tiene una o más desventajas, tales como dañar la capa externa de la piel (que puede ser doloroso e irritante para el paciente), tener una complejidad de tratamiento que desalienta el uso por un médico y/o pacientes, aumentar la complejidad y coste de fabricación relacionado y/o deteriora potencialmente la actividad biológica de los ácidos nucleicos.

Por tanto, existe la necesidad en la técnica de procedimientos de suministro transdérmico de ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos y residuos de ácido nucleico) que sean sencillos de usar, que sean económicos, que no dañen la capa externa de la piel, que protejan frente a la degradación enzimática sin inducir reacciones inmunitarias, que no deterioren la actividad biológica del ácido nucleico para suministrar y/o que puedan potenciar el suministro al sitio de acción biológica en el tejido diana.

Resumen de la invención

La presente invención describe una suspensión o dispersión de nanopartículas que comprende una población de partículas, donde la suspensión o dispersión de nanopartículas comprende una nanoemulsión, donde la mayoría de partículas tienen diámetros de entre 10 nanómetros y 300 nanómetros y donde las nanopartículas comprenden al menos un ácido nucleico de hasta 30 nucleótidos de longitud que tiene actividad biológica en la piel, tejido subcutáneo, músculo contiguo o tejido distante, donde la nanoemulsión comprende una premezcla de al menos un aceite, un tensioactivo, agua y el ácido nucleico, donde el aceite es un triglicérido de cadena media o aceite de soja y el tensioactivo es Tween. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas incorporan uno o más polinucleótidos no modificados y/o modificados (de hasta 50 nucleótidos de longitud) y/o residuos de ácido nucleico (p.ej., nucleótidos y/o nucleósidos) que son agentes biológicamente activos en la piel (p.ej., epidermis y/o dermis), tejido subcutáneo (p.ej., tejido adiposo), músculos contiguos y/o tejidos distantes (p.ej., órganos tales como pulmones, hígado, etc.).

Las nanopartículas de acuerdo con la invención (p.ej., nanopartículas que incorporan polinucleótidos no modificados y/o modificados) pueden aplicarse a la piel de un sujeto. En algunas realizaciones, las nanopartículas consiguen el suministro (en particular, el suministro transdérmico) de ácidos nucleicos incorporados (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico) al sujeto.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden aplicarse a la piel en forma de una suspensión o dispersión sencilla o mezclarse con uno o más excipientes y prepararse en forma de una formulación tal como, pero sin limitación, un suavizante cutáneo, loción nutritiva, loción limpiadora, crema limpiadora, leche cutánea, loción emoliente, crema de masaje, crema emoliente, base de maquillaje, lápiz de labios, paquete facial o gel facial,

formulación limpiadora (p.ej., champús, acondicionadores, limpiador corporal, tónicos capilares, jabones, etc.) y/o composición dermatológica (p.ej., lociones, pomadas, geles, cremas, parches, pulverizadores, etc.).

5 Por tanto, la presente invención proporciona sistemas y composiciones para el suministro (p.ej., suministro transdérmico) de ácido nucleico (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico tales como nucleótidos y/o nucleósidos). Entre las muchas ventajas de esta invención, está la capacidad de suministrar ácidos nucleicos (p.ej., nucleótidos y/o residuos de ácido nucleico) sin inyección y además sin el requisito de abrasión mecánica o química o alteración de la piel. Ventajas adicionales incluyen la capacidad de utilizar ácidos nucleicos no modificados simplificando y reduciendo así el coste de producción de las preparaciones cosméticas y/o farmacéuticas y, además, conservando (o potencialmente potenciando) la actividad biológica del ácido nucleico.

### Definiciones

15 *Abrasión:* El término "abrasión", como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier medio de alteración, disrupción, retirada o destrucción de la capa superior de la piel. En algunas realizaciones, abrasión hace referencia a un medio mecánico de alteración, disrupción, retirada o destrucción de la capa superior de la piel. En algunas realizaciones, abrasión hace referencia a un medio químico de alteración, disrupción, retirada o destrucción de la capa superior de la piel. Para dar solo unos pocos ejemplos, agentes tales como exfoliantes, partículas finas (p.ej., partículas de magnesio o aluminio), ácidos (p.ej., alfa-hidroxiácidos o beta-hidroxiácidos) y/o alcoholes pueden causar abrasión. En general, se espera que los potenciadores de la permeación tales como los descritos, por ejemplo, por Donovan (véanse, p.ej., las publicaciones de patente de EE.UU. 2004/009180 y 2005/175636 y la publicación PCT WO 04/06954) y Graham (véanse, p.ej., la patente de EE.UU. 6.939.852 y la publicación de patente de EE.UU. 2006/093624), etc., causen abrasión. Por supuesto los especialistas en la técnica apreciarán que un agente particular puede causar abrasión cuando está presente a una concentración, o en asociación con uno o más de otros agentes, pero puede no causar abrasión en diferentes circunstancias. Por tanto, que un material particular sea o no un "agente abrasivo" depende del contexto. La abrasión puede valorarse fácilmente por los especialistas en la técnica, por ejemplo, mediante la observación de la rojez o irritación de la piel y/o el examen histológico de piel que muestre alteración, disrupción, retirada o erosión del estrato córneo.

30 *Aminoácido:* Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, hace referencia a cualquier compuesto y/o sustancia que pueda incorporarse a una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un D-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un L-aminoácido. "Aminoácido estándar" hace referencia a cualquiera de los 20 L-aminoácidos estándar encontrados comúnmente en péptidos de origen natural. "Aminoácido no estándar" hace referencia a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándares, independientemente de si se prepara sintéticamente o se obtiene a partir de una fuente natural. Los aminoácidos, incluyendo aminoácidos carboxi- y/o aminoterminales en péptidos, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida en circulación del péptido sin afectar adversamente a su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. El término "aminoácido" se usa intercambiamente con "residuo aminoacídico", y puede hacer referencia a un aminoácido libre y/o a un residuo aminoacídico de un péptido. Resultará evidente a partir del contexto en que se use el término si hace referencia a un aminoácido libre o a un residuo de un péptido.

45 *Animal:* Como se usa en la presente memoria, el término "animal" hace referencia a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" hace referencia a seres humanos en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" hace referencia a animales no humanos en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones el animal no humano es un mamífero (p.ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado bovino, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero sin limitación, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, animal genomanipulado y/o un clon.

55 *Aproximadamente:* Como se usan en la presente memoria, los términos "aproximadamente" o "alrededor de" con referencia a un número se entiende que incluyen generalmente números que entran dentro del intervalo del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en cualquier dirección (mayor o menor) que el número, a menos que se indique otra cosa o sea evidente otra cosa por el contexto (excepto cuando tal número fuera menor de 0 % o superior a 100 % de un posible valor).

60 *Agente biológicamente activo:* Como se usa en la presente memoria, la frase "agente biológicamente activo" hace referencia a cualquier sustancia que tenga actividad en un sistema biológico y/u organismo. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activa. En realizaciones particulares, cuando un polinucleótido es biológicamente activo, se hace referencia a una porción de ese polinucleótido que comparte al menos una actividad biológica del polinucleótido como una porción "biológicamente activa".

*Porción característica:* Como se usa en la presente memoria, la frase una “porción característica” de una sustancia, en el sentido más amplio, es aquella que comparte cierto grado de identidad de secuencia y/o estructural y/o al menos una característica funcional con la sustancia intacta relevante. Por ejemplo, una “porción característica” de un polinucleótido es aquella que contiene un tramo continuo de residuos de ácido nucleico, o una colección de tramos continuos de residuos de ácido nucleico, que conjuntamente son característicos de un polinucleótido. En algunas realizaciones, cada uno de tales tramos continuos contendrá generalmente al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o más residuos de ácido nucleico. En general, es una porción característica aquella que, además de la identidad de secuencia especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con el polinucleótido intacto relevante. En algunas realizaciones, la porción característica puede ser biológicamente activa.

*Homología:* Como se usa en la presente memoria, el término “homología” hace referencia a la semejanza global entre moléculas poliméricas, p.ej. entre moléculas polinucleotídicas (p.ej., moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas polipeptídicas. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se considera que son “homólogas” entre sí si sus secuencias son al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idénticas. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se considera que son “homólogas” entre sí si sus secuencias son al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % similares.

*Hidrófilo:* Como se usa en la presente memoria, una sustancia “hidrófila” es una sustancia que puede ser soluble en disolventes polares. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófila puede unirse transitoriamente con disolventes polares. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófila se une transitoriamente con disolventes polares a través de enlaces de hidrógeno. En algunas realizaciones, el disolvente polar es agua. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófila puede ser iónica. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófila puede ser no iónica. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófila puede disolverse más fácilmente en agua, disolventes polares o disolventes hidrófilos que en aceite, disolventes no polares o disolventes hidrófobos. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófila puede disolverse menos fácilmente en aceite, disolventes no polares o disolventes hidrófobos que en agua, disolventes polares o disolventes hidrófilos. En algunas realizaciones, una sustancia es hidrófila respecto a otra sustancia porque es más soluble en agua, disolventes polares o disolventes hidrófilos que la otra sustancia. En algunas realizaciones, una sustancia es hidrófila respecto a otra sustancia porque es menos soluble en aceite, disolventes no polares o disolventes hidrófobos que la otra sustancia.

*Hidrófobo:* Como se usa en la presente memoria, una sustancia “hidrófoba” es una sustancia que puede ser soluble en disolventes no polares. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófoba es repelida por disolventes polares. En algunas realizaciones, el disolvente polar es agua. En algunas realizaciones, las sustancias hidrófobas son no polares. En algunas realizaciones, la sustancia hidrófoba puede disolverse más fácilmente en aceite, disolventes no polares o disolventes hidrófobos que en agua, disolventes polares o disolventes hidrófilos. En algunas realizaciones, una sustancia hidrófoba puede disolverse menos fácilmente en agua, disolventes polares o disolventes hidrófilos que en aceite, disolventes no polares o disolventes hidrófobos. En algunas realizaciones, una sustancia es hidrófoba respecto a otra sustancia porque es más soluble en aceite, disolventes no polares o disolventes hidrófobos que la otra sustancia. En algunas realizaciones, una sustancia es hidrófoba respecto a otra sustancia porque es menos soluble en agua, disolventes polares o disolventes hidrófilos que la otra sustancia.

*Identidad:* Como se usa en la presente memoria, el término “identidad” hace referencia a la semejanza global entre moléculas poliméricas, p.ej. entre moléculas polinucleotídicas (p.ej., moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas polipeptídicas. El cálculo de la identidad porcentual de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, puede efectuarse alineando las dos secuencias con fines de comparación óptima (p.ej., pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y segunda secuencias de ácido nucleico para alineamiento óptimo y pueden descartarse las secuencias no idénticas con fines de comparación). En ciertas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada con fines de comparación es de al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Se comparan entonces los nucleótidos en las correspondientes posiciones nucleotídicas. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido en la correspondiente posición de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que tienen que introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, la identidad porcentual entre dos secuencias nucleotídicas puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. La identidad porcentual entre dos secuencias nucleotídicas puede determinarse, como alternativa, usando el programa GAP del paquete de software GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP.

*Junto con:* Como se usa en la presente memoria, la frase “suministrado junto con” hace referencia al suministro conjunto de dos o más sustancias o agentes. En particular, de acuerdo con la presente invención, la frase se usa en la presente memoria con referencia al suministro de un agente biológicamente activo con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención. Una sustancia o agente se suministra junto con nanopartículas cuando la sustancia o agente se combina con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas, se encapsula o rodea completamente por nanopartículas. Una sustancia o agente para suministrar junto con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas puede estar ligado covalentemente o no a las nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas. Una sustancia o agente para suministrar junto con nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas puede estar enlazada o no con las nanopartículas y/o composiciones de nanopartículas por fuerzas de adsorción.

*Aislado:* Como se usa en la presente memoria, el término “aislado” hace referencia a una sustancia y/o entidad que (1) se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (en la naturaleza y/o en un entorno experimental) y/o (2) se ha producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse al menos alrededor de un 10 %, alrededor de un 20 %, alrededor de un 30 %, alrededor de un 40 %, alrededor de un 50 %, alrededor de un 60 %, alrededor de un 70 %, alrededor de un 80 %, alrededor de un 90 % o más de los demás componentes con los que estaba inicialmente asociada. En algunas realizaciones, las sustancias y/o entidades aisladas son más de un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % puras.

*Microfluidificado:* Como se usa en la presente memoria, el término “microfluidificado” significa expuesto a altas fuerzas de cizallamiento. En algunas realizaciones, tal exposición a altas fuerzas de cizallamiento se logra mediante exposición a alta presión; en algunas realizaciones, tal alta presión está dentro del intervalo de alrededor de 15.000 psi a alrededor de 26.000 psi. En algunas realizaciones, tal exposición a altas fuerzas de cizallamiento se logra por cavitación. En algunas realizaciones, tal exposición a altas fuerzas de cizallamiento se logra pasando una muestra a través de un instrumento tal como, por ejemplo, un Microfluidizer® (Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) u otro dispositivo similar que pueda ser útil en la creación de una composición uniforme de nanopartículas. En algunas realizaciones de la presente invención, se microfluidifica una muestra mediante exposición a altas fuerzas de cizallamiento durante un periodo de tiempo menor de alrededor de 10 minutos. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es menor de alrededor de 9, alrededor de 8, alrededor de 7, alrededor de 6, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2 o alrededor de 1 minuto. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo está dentro del intervalo de alrededor de 1-alrededor de 2 minutos. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es de alrededor de 30 segundos. En algunas realizaciones, se “microfluidifica” una muestra mediante exposición única a altas fuerzas de cizallamiento; se hace referencia a tales realizaciones como microfluidificación de “una pasada”.

*Nanopartícula:* Como se usa en la presente memoria, el término “nanopartícula” hace referencia a cualquier partícula que tenga un diámetro menor de 1.000 nanómetros (nm). En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro menor de 300 nm, como se define por la Fundación nacional para la ciencia. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro menor de 100 nm como se define por los Institutos nacionales de la salud.

*Composición de nanopartículas:* Como se usa en la presente memoria, el término “composición de nanopartículas” hace referencia a cualquier sustancia que contenga al menos una nanopartícula. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas es una colección uniforme de nanopartículas. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas son dispersiones o emulsiones. En general, se forma una dispersión o emulsión cuando se combinan al menos dos materiales inmiscibles. Una dispersión de “aceite en agua” es aquella en que se dispersan partículas oleosas (o hidrófobas o no polares) en un medio de dispersión acuoso. Una dispersión de “agua en aceite” es aquella en que se dispersan partículas acuosas (o hidrófilas o polares) en un medio de dispersión oleoso. Los especialistas en la técnica apreciarán que puede formarse una dispersión a partir de dos medios inmiscibles cualesquiera y no está limitada estrictamente a combinaciones de medios acuosos y oleosos. El término “medio de dispersión” se aplica por lo tanto ampliamente a cualquier medio de dispersión a pesar de que sea común hacer referencia a las categorías “acuosa” y “oleosa”. En algunas realizaciones particulares, una composición de nanopartículas comprende una nanoemulsión, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos de tramitación conjunta con la presente de número de serie 11/607.436, titulada “Botulinum Nanoemulsions” y presentada el 1 de diciembre de 2006. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas es estable. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye uno o más agentes biológicamente activos para suministrar junto con las nanopartículas.

*Ácido nucleico:* Como se usa en la presente memoria, el término “ácido nucleico”, en su sentido más amplio, hace referencia a cualquier compuesto y/o sustancia que esté en o pueda incorporarse a una cadena oligonucleotídica. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que está en o puede incorporarse a una cadena oligonucleotídica mediante un ligamiento fosfodiéster. En algunas realizaciones, “ácido nucleico” hace referencia a residuos de ácido nucleico individuales (p.ej., nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, “ácido nucleico” hace referencia a una cadena oligonucleotídica que comprende residuos de ácido nucleico individuales. Como se usan en la presente memoria, los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” pueden usarse intercambiamente. En algunas realizaciones, “ácido nucleico” engloba ARN así como ADN y/o ADNc monocatenario y/o bicatenario. Además, los términos “ácido nucleico”, “ADN”, “ARN” y/o términos similares incluyen

análogos de ácido nucleico, p.ej. análogos que tienen un esqueleto distinto del fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados "ácidos peptidonucleicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, se consideran dentro del alcance de la presente invención. El término "secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica" incluye todas las secuencias nucleotídicas que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia aminoacídica. Las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones. Los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinantes y opcionalmente purificarse, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea apropiado, p.ej. en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos nucleosídicos tales como análogos que tienen bases o azúcares modificados químicamente, modificaciones del esqueleto, etc. Una secuencia de ácido nucleico se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique otra cosa. El término "segmento de ácido nucleico" se usa en la presente memoria para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico que es una porción de una secuencia de ácido nucleico más larga. En muchas realizaciones, un segmento de ácido nucleico comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende nucleósidos naturales (p.ej., adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina); análogos nucleosídicos (p.ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C5-propinilcitidina, C5-propiniluridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases modificadas químicamente; bases modificadas biológicamente (p.ej., bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (p.ej., 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (p.ej., ligamientos fosforotioatos y 5'-N-fosforamidita). En algunas realizaciones, la presente invención está específicamente dirigida a "ácidos nucleicos no modificados", lo que significa ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos y residuos, incluyendo nucleótidos y/o nucleósidos) que no se han modificado químicamente para facilitar o conseguir el suministro (p.ej., suministro transdérmico).

*Nutracéutico:* Como se usa en la presente memoria, el término "nutracéutico" hace referencia a cualquiera sustancia que se cree que proporciona beneficios médicos, sanitarios o biológicos. En algunas realizaciones, los nutraceuticos pueden prevenir la enfermedad. En algunas realizaciones, los nutraceuticos pueden proporcionar un valor nutritivo básico. En algunas realizaciones, un nutraceutico es un alimento o parte de un alimento. En algunas realizaciones, un agente nutraceutico puede ser una clase de nutrientes aislados, suplementos dietéticos, vitaminas, minerales, hierbas, alimentos enriquecidos, alimentos curativos, alimentos genomanipulados y alimentos procesados. Los nutraceuticos pueden ser también conocidos como "alimentos fitoquímicos" o "alimentos funcionales".

*Paciente:* Como se usa en la presente memoria, el término "paciente" o "sujeto" hace referencia a cualquier organismo al que puede administrarse una composición de acuerdo con la invención, p.ej. con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (p.ej., mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano.

*Premezcla:* Como se usa en la presente memoria, el término "premezcla" hace referencia a cualquier combinación de componentes que se use posteriormente para generar una composición de nanopartículas de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, una premezcla es cualquier colección de ingredientes que, cuando se somete a altas fuerzas de cizallamiento, genera nanopartículas de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, una premezcla contiene dos o más disolventes inmiscibles. En algunas realizaciones, una premezcla contiene uno o más ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico tales como nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas realizaciones, una premezcla contiene al menos un agente biológicamente activo distinto. En algunas realizaciones, una premezcla se remueve, mezcla y/o agita; en algunas realizaciones, una premezcla se remueve, mezcla y/o agita antes de someterse a una alta fuerza de cizallamiento. En algunas realizaciones, una premezcla comprende al menos un componente solubilizado (es decir, al menos un componente que está en solución); en algunas de tales realizaciones, la premezcla se somete a alta fuerza de cizallamiento después de conseguir tal solubilización.

*Puro:* Como se usa en la presente memoria, una sustancia y/o entidad es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de alrededor de 90 % de una sustancia y/o entidad particular se considera típicamente que es una preparación pura. En algunas realizaciones, una sustancia y/o entidad es al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % pura.

*Fuerza de cizallamiento:* Como se usa en la presente memoria, el término "fuerza de cizallamiento" hace referencia a una fuerza que es paralela a la superficie de un material, en contraposición a una fuerza que es perpendicular a la superficie de un material. En algunas realizaciones, una composición se expone a altas fuerzas de cizallamiento para producir una composición uniforme de nanopartículas. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para generar altas fuerzas de cizallamiento. En algunas realizaciones, se usa cavitación para generar altas fuerzas de cizallamiento. En algunas realizaciones, se usa homogeneización a alta presión para generar altas fuerzas de cizallamiento. Como alternativa o adicionalmente, puede administrarse una alta fuerza de cizallamiento mediante exposición a alta presión, por ejemplo de alrededor de 15.000 psi. En algunas realizaciones, tal alta

presión está dentro del intervalo de alrededor de 18.000 psi a alrededor de 26.000 psi; en algunas realizaciones, está dentro del intervalo de alrededor de 20.000 psi a alrededor de 25.000 psi. En algunas realizaciones, se usa un procesador Microfluidizer<sup>®</sup> (Microfluidics Corporation/MFIC Corporation) u otro dispositivo similar para generar altas fuerzas de cizallamiento. Los procesadores Microfluidizer<sup>®</sup> proporcionan alta presión y una alta tasa de cizallamiento resultante al acelerar la composición a través de microcanales (que tienen típicamente dimensiones del orden de 75 micrómetros) a una alta velocidad (típicamente en el intervalo de 50 m/s-300 m/s) para reducción del tamaño al intervalo de nanoescala. A medida que el fluido sale de los microcanales, forma chorros que chocan con chorros de los microcanales opuestos. En los canales, el fluido experimenta un alto cizallamiento (de hasta  $10^7$  l/s) que es varios órdenes de magnitud superior al de las tecnologías convencionales. Las colisiones de chorros dan como resultado mezclado a nivel submicrométrico. Por lo tanto, en tales dispositivos, el alto cizallamiento y/o impacto puede conseguir reducción de tamaño de las partículas y mezclado multifásico. En algunas realizaciones de la presente invención, se expone una muestra a altas fuerzas de cizallamiento durante un periodo de tiempo menor de alrededor de 10 minutos. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es menor de alrededor de 9 minutos, alrededor de 8 minutos, alrededor de 7 minutos, alrededor de 6 minutos, alrededor de 5 minutos, alrededor de 4 minutos, alrededor de 3 minutos, alrededor de 2 minutos o alrededor de 1 minuto. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo está dentro del intervalo de alrededor de 1 minuto a alrededor de 2 minutos; en algunas realizaciones, el periodo de tiempo es menor de alrededor de 1 minuto; en algunas realizaciones, el periodo de tiempo es de alrededor de 30 segundos. En algunas realizaciones, se "microfluidifica" una muestra mediante una única exposición a altas fuerzas de cizallamiento; se hace referencia a tales realizaciones en la presente memoria como microfluidificación de "una pasada".

*Similitud:* Como se usa en la presente memoria, el término "similitud" hace referencia a la semejanza global entre moléculas poliméricas, p.ej. entre moléculas polinucleotídicas (p.ej., moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas polipeptídicas. El cálculo de la similitud porcentual de moléculas poliméricas entre sí puede efectuarse de la misma manera que el cálculo de la identidad porcentual, excepto porque el cálculo de la similitud porcentual tiene en cuenta sustituciones conservativas como se entiende en la técnica.

*Molécula pequeña:* En general, una "molécula pequeña" es una molécula orgánica que es menor de alrededor de 5 kilodáltones (kDa) de tamaño. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor de alrededor de 4 kDa, 3 kDa, alrededor de 2 kDa o alrededor de 1 kDa. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor de alrededor de 800 dáltones (Da), alrededor de 600 Da, alrededor de 500 Da, alrededor de 400 Da, alrededor de 300 Da, alrededor de 200 Da o alrededor de 100 Da. En algunas realizaciones, una molécula pequeña es menor de alrededor de 2.000 g/mol, menor de alrededor de 1.500 g/mol, menor de alrededor de 1.000 g/mol, menor de alrededor de 800 g/mol o menor de alrededor de 500 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas son no poliméricas. Típicamente, de acuerdo con la presente invención, las moléculas pequeñas no son proteínas, polipéptidos, oligopéptidos, péptidos, polinucleótidos, oligonucleótidos, polisacáridos, glicoproteínas, proteoglicanos, etc. Un derivado de una molécula pequeña hace referencia a una molécula que comparte el mismo núcleo estructural que la molécula pequeña original, pero que puede prepararse mediante una serie de reacciones químicas a partir de la molécula pequeña original. Como ejemplo, un profármaco de una molécula pequeña es un derivado de esa molécula pequeña. Un análogo de una molécula pequeña hace referencia a una molécula que comparte el mismo o similar núcleo estructural que la molécula pequeña original, y que se sintetiza mediante una vía similar o relacionada, o variación reconocida en la técnica, a la molécula pequeña original.

*Estable:* El término "estable", cuando se aplica a las composiciones de nanopartículas de la presente memoria, significa que las composiciones mantienen uno o más aspectos de su estructura física (p.ej., intervalo de tamaño y/o distribución de partículas) durante un periodo de tiempo. En algunas realizaciones, es una composición de nanopartículas estable aquella para la que se mantiene el tamaño medio de partícula, el tamaño máximo de partícula, el intervalo de tamaños de partícula y/o la distribución de tamaños de partícula (es decir, el porcentaje de partículas por encima de un tamaño designado y/o fuera de un intervalo de tamaños designado) durante un periodo de tiempo. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es de al menos alrededor de 1 hora; en algunas realizaciones, el periodo de tiempo es de alrededor de 5 horas, 10 horas, un (1) día, una (1) semana, dos (2) semanas, un (1) mes, dos (2) meses, tres (3) meses, cuatro (4) meses, cinco (5) meses, seis (6) meses, ocho (8) meses, diez (10) meses, doce (12) meses, veinticuatro (24) meses o más. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo está dentro del intervalo de alrededor de un (1) día a veinticuatro (24) meses, dos (2) semanas a doce (12) meses, dos (2) meses a cinco (5) meses, etc. Por ejemplo, si se somete una composición de nanopartículas a un almacenamiento prolongado, cambios de temperatura y/o cambios de pH y una mayoría de las nanopartículas de la composición mantienen un diámetro dentro del intervalo indicado (por ejemplo, entre aproximadamente 10 nm-120 nm), la composición de nanopartículas es estable. Para algunas de tales poblaciones, una mayoría es más de alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, alrededor de 99,5 %, alrededor de 99,6 %, alrededor de 99,7 %, alrededor de 99,8 %, alrededor de 99,9 % o más. En algunas realizaciones, cuando una composición de nanopartículas comprende al menos un agente biológicamente activo, la composición de nanopartículas se considera estable si la concentración de agente biológicamente activo (p.ej., ácido nucleico) se mantiene en la composición durante el periodo designado de tiempo en un conjunto designado de condiciones.

65

*Sustancialmente:* Como se usa en la presente memoria, el término “sustancialmente” hace referencia a la condición cualitativa de exhibir una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un especialista en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, o nunca, llegan hasta la terminación y/o prosiguen hasta completitud ni consiguen o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término “sustancialmente” se usa en la presente memoria para captar la falta potencial de completitud inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

*Sustancialmente libre de.* Se dice que una composición de nanopartículas está “sustancialmente libre de” partículas cuyo diámetro esté fuera de un intervalo indicado cuando no más de alrededor del 50 % de las partículas en esa composición tienen diámetros fuera del intervalo. En algunas realizaciones, no más del 25 % de las partículas están fuera del intervalo. En algunas realizaciones, no más del 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o menos de partículas tienen diámetros fuera del intervalo indicado.

*Que padece:* Un individuo “que padece” una enfermedad, trastorno o afección (p.ej., heridas, proliferación celular cutánea anormal, enfermedades del tejido conectivo tales como escleroderma, paquioniquia congénita, inflamación cutánea, psoriasis, quemadura solar u otros tipos de daño cutáneo, cáncer de piel, etc.) se ha diagnosticado con o exhibe síntomas de la enfermedad, trastorno o afección.

*Cantidad terapéuticamente efectiva:* Como se usa en la presente memoria, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad de composición de nanopartículas que es suficiente, cuando se administra a un paciente que padece o es susceptible de una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar la enfermedad, trastorno y/o afección.

*Agente terapéutico:* Como se usa en la presente memoria, la frase “agente terapéutico” hace referencia a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o desencadena un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

*Tratamiento:* Como se usa en la presente memoria, el término “tratamiento” (también “tratar” o “tratando”) hace referencia a cualquier administración de un agente biológicamente activo que alivie, mejore, mitigue, inhiba, retarde el inicio de, reduzca la gravedad de y/o reduzca la incidencia parcial o completamente de uno o más síntomas o rasgos de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no exhibe signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o un sujeto que exhibe solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Como alternativa o adicionalmente, tal tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante.

*Disolvente tóxico:* Como se usa en la presente memoria, el término “disolvente tóxico” hace referencia a cualquier sustancia que pueda alterar, perturbar, retirar o destruir un tejido de animal. Como se entendería por un especialista en la técnica, un tejido de animal puede incluir células vivas, células muertas, matriz extracelular, uniones celulares, moléculas biológicas, etc. Para dar solo unos pocos ejemplos, los disolventes tóxicos incluyen dimetilsulfóxido, dimetilacetimida, dimetilformamida, cloroformo, tetrametilformamida, acetona, acetatos y alcanos.

*Uniforme:* El término “uniforme”, cuando se usa en la presente memoria con referencia a una composición de nanopartículas, hace referencia a una composición de nanopartículas en que las nanopartículas individuales tienen un intervalo especificado de tamaños de diámetro de partícula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición uniforme de nanopartículas es aquella en que la diferencia entre el diámetro mínimo y el diámetro máximo no supera alrededor de 600 nm, alrededor de 550 nm, alrededor de 500 nm, alrededor de 450 nm, alrededor de 400 nm, alrededor de 350 nm, alrededor de 300 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 200 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 90 nm, alrededor de 80 nm, alrededor de 70 nm, alrededor de 60 nm, alrededor de 50 nm o menos nm. En algunas realizaciones, las partículas (p.ej., partículas que contienen ácido nucleico) en composiciones uniformes de nanopartículas de acuerdo con la invención tienen diámetros que son menores de alrededor de 600 nm, alrededor de 550 nm, alrededor de 500 nm, alrededor de 450 nm, alrededor de 400 nm, alrededor de 350 nm, alrededor de 300 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 200 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 130 nm, alrededor de 120 nm, alrededor de 115 nm, alrededor de 110 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 90 nm, alrededor de 80 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas (p.ej. partículas que contienen ácido nucleico) en composiciones uniformes de nanopartículas de acuerdo con la invención tienen diámetros dentro del intervalo de alrededor de 10 y alrededor de 600 nanómetros. En algunas realizaciones, las partículas (p.ej., partículas que contienen ácido nucleico) en composiciones uniformes de nanopartículas de acuerdo con la invención tienen diámetros dentro del intervalo de alrededor de 10 nm-alrededor de 300 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 200 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 150 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 130 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 120 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 115 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 110 nm, alrededor de 10 nm-alrededor de 100 nm o alrededor de 10 nm-alrededor de 90 nm. En algunas realizaciones, las partículas (p.ej., partículas que contienen ácido nucleico) en composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención tienen un tamaño medio de partícula que está por debajo de alrededor de 300 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 200 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 130 nm, alrededor de 120 nm, alrededor de 115 nm, alrededor de 110 nm, alrededor de 100 nm o alrededor de 90 nm. En algunas realizaciones, el

tamaño medio de partícula está dentro del intervalo de alrededor de 10 nm-alrededor de 300 nm, alrededor de 50 nm-alrededor de 250 nm, alrededor de 60 nm-alrededor de 200 nm, alrededor de 65 nm-alrededor de 150 nm, alrededor de 70 nm-alrededor de 130 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es de alrededor de 80 nm-alrededor de 110 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es de alrededor de 90 nm-alrededor de 100 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las partículas (p.ej., partículas que contienen ácido nucleico) en las composiciones uniformes de nanopartículas de acuerdo con la invención tienen diámetros por debajo de un tamaño especificado o dentro de un intervalo especificado. En algunas realizaciones, la mayoría es más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más de las partículas de la composición. En algunas realizaciones, se consigue una composición uniforme de nanopartículas mediante microfluidización de una muestra. En algunas realizaciones, se prepara una composición uniforme de nanopartículas mediante exposición a alta fuerza de cizallamiento, p.ej. por microfluidización.

*Ácido nucleico no modificado:* Como se usa en la presente memoria, el término “ácido nucleico no modificado” hace referencia a un ácido nucleico (p.ej., polinucleótido, nucleótido, nucleósido, etc.) que no se ha modificado químicamente mediante la adición de otros grupos funcionales unidos covalentemente que se pretende que consigan el suministro (p.ej., suministro transdérmico) del polinucleótido, nucleótido y/o nucleósido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no se ha modificado para añadir un grupo fosfato. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no se ha modificado químicamente para añadir ningún grupo fosfato funcional.

#### Descripción de ciertas realizaciones

##### *Nanopartículas*

Como se discute en la presente memoria, la presente invención describe composiciones de nanopartículas. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas incorporan uno o más ácidos nucleicos no modificados o modificados (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico tales como nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, tales composiciones de nanopartículas incluyen además uno o más de otros agentes biológicamente activos además de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas se formulan con uno o más de otros componentes, por ejemplo en una preparación farmacéutica o cosmética. En algunas realizaciones, se formula tal preparación farmacéutica o cosmética para conseguir el suministro (en particular el suministro transdérmico) de ácidos nucleicos (y/o uno o más de otros agentes biológicamente activos). En algunas realizaciones, se formula tal preparación farmacéutica o cosmética para conseguir el suministro (en particular el suministro transdérmico) de ácidos nucleicos que se han seleccionado por su actividad en el sitio de acción biológica. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se han modificado para potenciar su actividad en el sitio de acción biológica.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas comprenden una población de nanopartículas. En algunas realizaciones, las nanopartículas incorporan uno o más ácidos nucleicos no modificados o modificados (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico, tales como nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, tales nanopartículas incluyen además uno o más de otros agentes biológicamente activos además de ácidos nucleicos.

#### Características de las nanopartículas

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención son estables. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención son uniformes.

En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas comprende una población de partículas cuya diferencia entre los diámetros mínimo y máximo no supera aproximadamente 600 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 450 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 200 nm, aproximadamente 150 nm o aproximadamente 100 nm.

En algunas realizaciones, las nanopartículas de acuerdo con la invención tienen diámetros que son menores de alrededor de 1.000 nm, alrededor de 600 nm, alrededor de 550 nm, alrededor de 500 nm, alrededor de 450 nm, alrededor de 400 nm, alrededor de 350 nm, alrededor de 300 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 200 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 130 nm, alrededor de 120 nm, alrededor de 115 nm, alrededor de 110 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 90 nm, alrededor de 80 nm, alrededor de 50 nm o menos.

En algunas realizaciones, las nanopartículas de acuerdo con la invención tienen un diámetro de 1 nm a 1.000 nm, de 1 nm a 600 nm, de 1 nm a 500 nm, de 1 nm a 400 nm, de 1 nm a 300 nm, de 1 nm a 200 nm, de 1 nm a 150 nm, de 1 nm a 120 nm, de 1 nm a 100 nm, de 1 nm a 75 nm, de 1 nm a 50 nm o de 1 nm a 25 nm. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas tienen un diámetro de 1 nm a 15 nm, de 15 nm a 200 nm, de 25 nm a 200 nm, de 50 nm a 200 nm o de 75 nm a 200 nm.

5 En algunas realizaciones, la distribución de partículas totales está englobada dentro del intervalo especificado de tamaño de diámetro de partícula. En algunas realizaciones, menos del 50 %, 25 %, 10 %, 5 % o 1 % de la distribución de partículas totales está fuera del intervalo especificado de tamaños de diámetro de partícula. En algunas realizaciones, menos del 1 % de la distribución de partículas totales está fuera del intervalo especificado de tamaños de diámetro de partícula. En ciertas realizaciones, la composición de nanopartículas está sustancialmente libre de partículas que tienen un diámetro mayor de 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 120 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm o 25 nm.

10 En algunas realizaciones, las nanopartículas en composiciones de nanopartículas tienen un tamaño medio de partícula que está por debajo de alrededor de 300 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 200 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 130 nm, alrededor de 120 nm, alrededor de 115 nm, alrededor de 110 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 90 nm o alrededor de 50 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula está dentro del intervalo de alrededor de 10 nm-alrededor de 300 nm, alrededor de 50 nm-alrededor de 250, alrededor de 60 nm-alrededor de 200 nm, alrededor de 65 nm-alrededor de 150 nm o alrededor de 70 nm-alrededor de 130 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es de alrededor de 80 nm-alrededor de 110 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partícula es alrededor de 90 nm-alrededor de 100 nm.

20 En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención están sustancialmente libres de partículas que tienen un diámetro superior a 300 nm. Específicamente, en algunas realizaciones, menos del 50 % de las nanopartículas en las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención tienen un diámetro superior a 300 nm. En algunas realizaciones, menos del 25 % de las partículas tienen un diámetro superior a 300 nm. En algunas realizaciones, menos del 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o menos de las partículas tienen un diámetro superior a 300 nm. Además, en algunas realizaciones, las nanopartículas en las composiciones de nanopartículas tienen diámetros dentro del intervalo de 10 nm-300 nm.

30 En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención están sustancialmente libres de partículas que tienen un diámetro superior a 200 nm. Específicamente, en algunas realizaciones, menos del 50 % de las nanopartículas en composiciones de nanopartículas tienen un diámetro superior a 200 nm. En algunas realizaciones, menos del 25 % de las partículas tienen un diámetro superior a 200 nm. En algunas realizaciones, menos del 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o menos de las partículas tienen un diámetro superior a 200 nm. Además, en algunas realizaciones, las nanopartículas en las composiciones de nanopartícula tienen diámetros dentro del intervalo de 10 nm-200 nm.

35 En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención están sustancialmente libres de partículas que tienen un diámetro superior a 120 nm. Específicamente, en algunas realizaciones, menos del 50 % de las nanopartículas en las composiciones de nanopartículas tienen un diámetro superior a 120 nm. En algunas realizaciones, menos del 25 % de las partículas tienen un diámetro superior a 120 nm. En algunas realizaciones, menos del 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o menos de las partículas tienen un diámetro superior a 120 nm.

45 En algunas realizaciones, la mayoría de las nanopartículas en las composiciones de nanopartículas tienen diámetros por debajo de un tamaño especificado o dentro de un intervalo especificado. En algunas realizaciones, la mayoría es más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más de las partículas en la composición.

50 En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 10 nm y 120 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 120 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 110 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 100 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 90 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 80 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 70 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 60 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 50 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 40 nm. En algunas realizaciones, una mayoría de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 20 nm y 30 nm.

65 En ciertas realizaciones, alrededor del 50 % de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 10 nm y 40 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 90 % de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 10 nm y 80 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 90 % de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 10 nm y 90 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 95 % de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros

entre 10 nm y 110 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 95 % de las nanopartículas en una composición de nanopartículas tienen diámetros entre 10 nm y 120 nm.

En ciertas realizaciones, alrededor del 50 % del volumen agregado de todas las nanopartículas en una composición de nanopartículas comprende o consiste en nanopartículas que tienen diámetros entre 10 nm y 40 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 90 % del volumen agregado de todas las nanopartículas en una composición de nanopartículas comprende o consiste en nanopartículas que tienen diámetros entre 10 nm y 80 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 95 % del volumen agregado de todas las nanopartículas en una composición de nanopartículas comprende o consiste en nanopartículas que tienen diámetros entre 10 nm y 110 nm. En ciertas realizaciones, alrededor del 95 % del volumen agregado de todas las nanopartículas en una composición de nanopartículas comprende o consiste en nanopartículas que tienen diámetros entre 10 nm y 120 nm.

El potencial zeta es una medida del potencial eléctrico en un plano de corte. Un plano de corte es la superficie imaginaria que separa una capa fina de líquido unida a una superficie sólida (p.ej., superficie de nanopartícula) y que muestra comportamiento elástico, mostrando el resto del líquido (p.ej., medio de dispersión líquido) el comportamiento viscoso normal. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta en el intervalo entre -80 mV y +80 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta en el intervalo entre -50 mV y +50 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta en el intervalo entre -25 mV y +25 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta en el intervalo entre -10 mV y +10 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta de alrededor de -80 mV, alrededor de -70 mV, alrededor de -60 mV, alrededor de -50 mV, alrededor de -40 mV, alrededor de -30 mV, alrededor de -25 mV, alrededor de -20 mV, alrededor de -15 mV, alrededor de -10 mV o alrededor de -5 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta de alrededor de +50 mV, alrededor de +40 mV, alrededor de +30 mV, alrededor de +25 mV, alrededor de +20 mV, alrededor de +15 mV, alrededor de +10 mV o alrededor de +5 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de 0 mV.

En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -80 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -70 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -60 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -50 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -40 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -30 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV a alrededor de -20 mV.

En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -15 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -80 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -70 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -60 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -50 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -40 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -30 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de -20 mV.

En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -80 mV a alrededor de -70 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -70 mV a alrededor de -60 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -60 mV a alrededor de -50 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -50 mV a alrededor de -40 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -40 mV a alrededor de -30 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -30 mV a alrededor de -20 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -20 mV a alrededor de -10 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -10 mV a alrededor de 0 mV.

En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -15 mV a alrededor de -20 mV. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un potencial zeta que es de alrededor de -5 mV, alrededor de -6 mV, alrededor de -7 mV, alrededor de -8 mV, alrededor de -9 mV, -10 mV, alrededor de -11 mV, alrededor de -12 mV, alrededor de -13 mV, alrededor de -14 mV, alrededor de -15 mV, alrededor de 16 mV, alrededor de -17 mV, alrededor de -18 mV, alrededor de -19 mV o alrededor de -20 mV.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención son emulsiones o dispersiones. En general, se forma una emulsión o dispersión a partir de al menos dos materiales inmiscibles, uno de los cuales constituye el medio de dispersión (es decir, el medio líquido en que se dispersan las partículas (p.ej. nanopartículas) que constituyen el "medio dispersado"). Una dispersión de "aceite en agua" es aquella en que se dispersan partículas oleosas en un medio de dispersión acuoso. Una dispersión de "agua en aceite" es aquella en

que se dispersan partículas acuosas en un medio de dispersión oleoso. Las dispersiones de aceite en agua y agua en aceite se discuten con más detalle a continuación. Los especialistas en la técnica apreciarán que puede formarse una dispersión a partir de dos medios inmiscibles cualesquiera y que no está limitada estrictamente a combinaciones de medios acuosos y oleosos. El término "medio de dispersión" se aplica por lo tanto ampliamente a cualquier medio de dispersión, a pesar de que sea común hacer referencia a las categorías "acuoso" y "oleoso". Por ejemplo, pueden prepararse emulsiones o dispersiones a partir de conjuntos inmiscibles de materiales hidrófobos/hidrófilos; materiales polares/no polares, etc., independientemente de si tales materiales son estrictamente hablando "acuosos" u "oleosos".

#### 10 Producción de nanopartículas

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención se autoensamblan a partir de una colección de componentes combinados. En algunas realizaciones, se preparan las composiciones de nanopartículas sometiendo una combinación de componentes (es decir, una "premezcla") a una alta fuerza de cizallamiento. En algunas realizaciones, se aplica la alta fuerza de cizallamiento por alta presión, por cavitación, por homogeneización y/o por microfluidización. En algunas realizaciones, los componentes formadores de nanopartículas combinados se remueven, agitan o mezclan de otro modo. En algunas de tales realizaciones, se someten los componentes a una alta fuerza de cizallamiento después de mezclarse. En algunas realizaciones específicas, el mezclado puede efectuarse durante un periodo de tiempo tal como por ejemplo menor de 1 hora o mayor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 horas. En algunas realizaciones, se consigue la solubilización.

En algunas realizaciones, la producción de composiciones de nanopartículas implica dializar una colección de componentes, por ejemplo para retirar cualquier disolvente orgánico, y/o liofilizar produciendo una composición.

En algunas realizaciones de la presente invención que utilizan una premezcla, ha de entenderse que los componentes de premezcla pueden ensamblarse en partículas antes de la aplicación de la alta fuerza de cizallamiento. Al menos algunas de tales partículas pueden ser micropartículas o incluso nanopartículas. En algunas realizaciones, se prepara una composición de nanopartículas a partir de una premezcla, donde la premezcla se selecciona de entre el grupo que comprende una suspensión o una microemulsión. Sin embargo, en algunas realizaciones, las estructuras de partícula no se forman en la premezcla antes de la aplicación de la alta fuerza de cizallamiento.

En algunas realizaciones de la presente invención, todos los componentes presentes en la composición de nanopartículas final están presentes en la premezcla y se someten a una alta fuerza de cizallamiento para producir la composición de nanopartículas. En algunas realizaciones de la presente invención, uno o más de los componentes que están presentes en la composición final de nanopartículas faltan de la premezcla o están presentes en la premezcla en una cantidad menor que en la composición final de nanopartículas. Es decir, en algunas realizaciones de la presente invención, se añaden uno o más materiales a la composición de nanopartículas después de someter la premezcla a una alta fuerza de cizallamiento.

En ciertas realizaciones, se prepara la premezcla en forma de una solución antes de la aplicación de la alta fuerza de cizallamiento. En particular, para composiciones de nanopartículas que incluyen al menos un agente biológicamente activo (p.ej. un ácido nucleico), a menudo es deseable que el agente biológicamente activo esté disuelto en la premezcla antes de aplicar la alta fuerza de cizallamiento. Por tanto, en muchas realizaciones, el agente biológicamente activo es soluble en al menos uno de los medios (o una combinación de medios utilizados en la premezcla). En algunas realizaciones, tal disolución requiere calentamiento; en otras realizaciones no.

#### Composición de nanopartículas

En algunas realizaciones, se preparan composiciones de nanopartículas a partir de componentes que incluyen uno o más medios acuosos, polares o hidrófilos, uno o más medios oleosos, no polares o hidrófobos, uno o más tensioactivos o emulsionantes, uno o más agentes biológicamente activos y/o uno o más agentes retardantes de la liberación, etc.

Los especialistas en la técnica estarán al tanto de los medios acuosos adecuados que pueden usarse como medios de dispersión o como medios para dispersar de acuerdo con la presente invención. Tales medios acuosos representativos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas (incluyendo solución salina tamponada con fosfato), agua para inyecciones, alcoholes de cadena corta, dextrosa al 5 %, soluciones de Ringer (inyección de Ringer lactosada, inyección de Ringer lactosada más 5 % de dextrosa, inyección de Ringer acilada), NORMOSOL<sup>®</sup>M, ISOLYTE E y similares y combinaciones de los mismos.

Los especialistas en la técnica estarán también al tanto de los medios oleosos adecuados que pueden usarse como medios de dispersión o como medios para dispersar de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el aceite puede comprender uno o más grupos ácidos grasos o sales de los mismos. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede comprender hidrocarburos sustituidos o no sustituidos de cadena larga (p.ej., C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub>) digeribles. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser un ácido graso C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub> o sal del

mismo. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser un ácido graso C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub> o sal del mismo. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser un ácido graso C<sub>15</sub>-C<sub>25</sub> o sal del mismo. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede estar poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo ácido graso insaturado puede estar en la conformación *cis*. En algunas realizaciones, un doble enlace de un ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.

En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vacénico, linoleico, alfa-linolénico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentenoico, docosahexenoico o erúxico.

En algunas realizaciones, el aceite es un triglicérido líquido. En algunas realizaciones, el aceite es un triglicérido de cadena media. En general, los triglicéridos de cadena media son ácidos grasos que contienen 6-12 átomos de carbono (p.ej., ácido caprílico, ácido octanoico, ácido cáprico, ácido decanoico, ácido láurico, etc.) y pueden obtenerse a partir de aceite de coco o aceite de semilla de palma. En algunas realizaciones, el aceite 1349 es un triglicérido de cadena media que puede utilizarse de acuerdo con la invención.

Los aceites adecuados para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, de almendra, semilla de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semilla de grosella negra, borraja, cada, manzanilla, colza, alcaravea, carnauba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emú, eucalipto, onagra vespertina, pescado, semilla de lino, geraniol, calabaza, semilla de uva, avellana, hisopo, miristato de isopropilo, yoyoba, nuez de kukui, lavándula, lavanda, limón, verbena exótica, nuez de macadamia, malva, semilla de mango, semilla de espuma de la pradera, mineral, visón, nuez moscada, oliva, naranja, reloj anaranjado, palma, semilla de palma, semilla de melocotón, cacahuete, semilla de amapola, semilla de calabaza, semilla de colza, salvado de arroz, romero, cártamo, madera de sándalo, sasquana, ajedrea, espinoso amarillo, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, tsubaki, vetiver, nuez, germen de trigo y mezclas de los mismos. Los aceites sintéticos adecuados para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación: triglicérido caprílico/cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, octildodecanol, alcohol oleico, aceite 1349 y combinaciones de los mismos.

Los tensioactivos o agentes emulsionantes adecuados incluyen, pero sin limitación, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; succinato de diacilglicerol; difosfatidilglicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietilen-9-lauriléter; un ácido graso tensioactivo tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; amidas de ácido graso; trioleato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup>85); glicocolato; monolaurato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup>20); polisorbato 20 (TWEEN<sup>®</sup>20); polisorbato 60 (TWEEN<sup>®</sup>60); polisorbato 65 (TWEEN<sup>®</sup>65); polisorbato 80 (TWEEN<sup>®</sup>80); polisorbato 85 (TWEEN<sup>®</sup>85); monoestearato de poloxietileno; surfactina; un poloxámero; un éster de ácido graso de sorbitán tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lecitina de soja; lisolecitina; lipóide; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilamina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecilo; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; monoestearato de poli(etilenglicol)400 y fosfolípidos. El componente tensioactivo puede ser una mezcla de diferentes tensioactivos. Estos tensioactivos pueden extraerse y purificarse de una fuente natural o pueden prepararse sintéticamente en un laboratorio. En una realización preferida, los tensioactivos están comercialmente disponibles.

En ciertas realizaciones, las cantidades relativas de componentes utilizadas para preparar composiciones de nanopartículas se seleccionan o ajustan para generar nanopartículas que tienen las características deseadas. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas (p.ej. que comprenden nanopartículas que incorporan polinucleótidos no modificados y/o modificados) comprenden tensioactivo, aceite y/o medio acuoso (p.ej. agua) en relaciones especificadas. En algunas realizaciones, el aceite y el tensioactivo se utilizan a una relación en el intervalo entre 0,5-10. En algunas realizaciones, la relación de aceite a tensioactivo es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1 o aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, la relación de tensioactivo a aceite es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1 o aproximadamente 10:1.

En algunas realizaciones, aceite y tensioactivo se utilizan a una relación en el intervalo entre 0,5-2. En ciertas realizaciones, la relación de aceite a tensioactivo es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 2:1. En ciertas realizaciones, la relación de tensioactivo a aceite es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 2:1. En ciertas realizaciones específicas, la relación de aceite a tensioactivo es aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones, las composiciones que utilizan tales relaciones de aceite a tensioactivo comprenden emulsiones de aceite en agua. En algunas realizaciones, las composiciones que utilizan tales relaciones de aceite a tensioactivo comprenden nanopartículas que incorporan polinucleótidos no modificados y/o modificados.

5 En algunas realizaciones, agua y tensioactivo se utilizan a una relación que oscila entre 0,5-10. En algunas realizaciones, la relación de agua a tensioactivo es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1 o aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, la relación de tensioactivo a agua es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1 o aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, se utilizan agua y tensioactivo a una relación que oscila entre 0,5-2. En ciertas realizaciones, la relación de agua a tensioactivo es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 2:1. En ciertas realizaciones, la relación de tensioactivo a agua es aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 2:1. En ciertas realizaciones específicas, la relación de agua a tensioactivo es aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, las composiciones que utilizan tales relaciones de agua a tensioactivo comprenden emulsiones de agua en aceite.

20 En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite en la composición a partir de la que se preparan las nanopartículas (p.ej., en la premezcla) oscila entre 0 % y 30 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite en la composición de la que se preparan las nanopartículas (p.ej. en la premezcla) es aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 % o aproximadamente 30 %. En algunas realizaciones el porcentaje de aceite es aproximadamente 9 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de aceite es aproximadamente 5 %.

30 El porcentaje de agua en la premezcla puede oscilar de 0 % a 99 %, de 10 % a 99 %, de 25 % a 99 %, de 50 % a 99 % o de 75 % a 99 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agua en la premezcla puede oscilar de 0 % a 75 %, de 0 % a 50 %, de 0 % a 25 %, o de 0 % a 10 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agua en la composición de la que se preparan las nanopartículas (p.ej. en la premezcla) oscila entre 0 % y 30 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agua es aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 % o aproximadamente 30 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agua es aproximadamente 9 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agua es aproximadamente 5 %.

45 El porcentaje de sustancias con actividad tensioactiva en la premezcla puede oscilar de 0 % a 99 %, de 10 % a 99 %, de 25 % a 99 %, de 50 % a 99 % o de 75 % a 99 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de sustancias con actividad tensioactiva en la premezcla puede oscilar de 0 % a 75 %, de 0 % a 50 %, de 0 % a 25 % o de 0 % a 10 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de sustancias con actividad tensioactiva en la composición de la que se preparan las nanopartículas (p.ej., en la premezcla) oscila entre 0 % y 30 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de sustancias con actividad tensioactiva es aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 % o aproximadamente 30 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de sustancias con actividad tensioactiva es aproximadamente 9 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de sustancias con actividad tensioactiva es aproximadamente 5 %.

60 En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas no contiene más de un aceite. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas puede comprender dos o más aceites. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas no contiene más de un tensioactivo. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas puede comprender dos o más tensioactivos. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas está completamente libre o sustancialmente libre de componentes tóxicos.

65

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste esencialmente en agua, un aceite, un tensioactivo y al menos un agente biológicamente activo (p.ej., un ácido nucleico). En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste esencialmente en agua, un aceite, un tensioactivo, al menos un agente biológicamente activo y al menos una sustancia usada para producir y/o conservar la composición de nanopartículas.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste en agua, un aceite, un tensioactivo y un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas consiste en agua, un aceite, un tensioactivo, un ácido nucleico y al menos una sustancia usada para producir y/o conservar las nanopartículas.

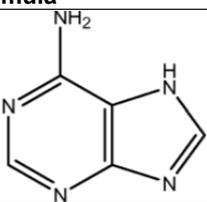
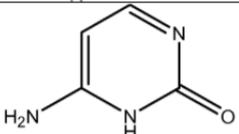
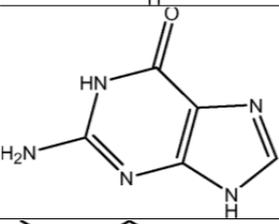
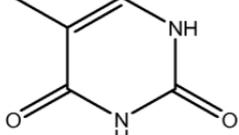
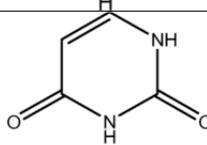
*Ácidos nucleicos*

Puede incorporarse cualquiera de una variedad de ácidos nucleicos a composiciones de nanopartículas de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el ácido nucleico para incorporar a una composición de nanopartículas es un polinucleótido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico para incorporar a una composición de nanopartículas es un nucleótido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico para incorporar a una composición de nanopartículas es un nucleósido.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico es menor de alrededor de 50 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es menor de alrededor de 90, alrededor de 80, alrededor de 70, alrededor de 65, alrededor de 60, alrededor de 55, alrededor de 50, alrededor de 45, alrededor de 40, alrededor de 35, alrededor de 30, alrededor de 25, alrededor de 20, alrededor de 15, alrededor de 13, alrededor de 12, alrededor de 10, alrededor de 9, alrededor de 8, alrededor de 7, alrededor de 6, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3 o alrededor de 2 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones específicas, un ácido nucleico es un único residuo de ácido nucleico (p.ej., un único nucleótido o un único nucleósido). En algunas realizaciones, el ácido nucleico para incorporar a una composición de nanopartículas comprende solo residuos de ácido nucleico de origen natural (p.ej., nucleótidos, nucleósidos). En algunas realizaciones, un ácido nucleico comprende uno o más residuos de ácido nucleico de origen no natural.

En general, un nucleósido comprende un azúcar pentosa (p.ej., ribosa o desoxirribosa) y una base nitrogenada heterocíclica (p.ej., purinas: citosina, timidina y uracilo; y pirimidinas: guanina y adenina; véase la Tabla 1) ligados covalentemente por un enlace glicosídico. En general, un nucleótido comprende un nucleósido y de uno a tres grupos 5' fosfato.

Tabla 1: Bases nitrogenadas heterocíclicas

Nombre trivial	Símbolo	Nombre sistemático	Fórmula
Adenina (6-aminopurina)	A	7H-purin-6-amina	
Citosina	C	4-amino-3H-pirimidin-2-ona	
Guanina (2-amino-6-oxopurina; 2-aminohipoxantina)	G	2-amino-1H-purin-6(9H)-ona	
Timina (5-metiluracilo)	T	5-metilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona	
Uracilo (2-oxi-4-oxipirimidina; 2,4-(1H,3H)-pirimidindiona; 2,4-dihidroxipirimidina; 2,4-pirimidindiol)	U	pirimidin-2,4(1H,3H)-diona	

En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser ADN, ARN o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede ser un oligonucleótido y/o polinucleótido. Como se usan en la presente memoria, los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" pueden usarse intercambiamente. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un oligonucleótido y/u oligonucleótido modificado (incluyendo, pero sin limitación, modificaciones por fosforilación); un oligonucleótido anticodificante y/u oligonucleótido anticodificante modificado (incluyendo, pero sin limitación, modificaciones por fosforilación). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede comprender ADNc y/o ADN genómico. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede comprender ADN y/o ARN no humano (p.ej., secuencias de ácido nucleico vírico, bacteriano o fúngico). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un plásmido, cósmido, fragmento génico, cromosoma artificial y/o natural (p.ej., un cromosoma artificial de levadura) y/o una parte de los mismos. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un ARN funcional (p.ej., ARNm, ARNt, un ARNr y/o una ribozima). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un agente inductor de iARN, ARN interferente pequeño (siARN), ARN de horquilla corto (shARN) y/o microARN (miARN). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un ácido peptidonucleico (APN). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un polinucleótido que comprende análogos sintéticos de ácidos nucleicos, que pueden estar modificados o no modificados. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede comprender diversas formas estructurales de ADN que incluyen ADN monocatenario, ADN bicatenario, ADN superenrollado y/o ADN de triple hélice; ADN-Z y/o combinaciones de los mismos.

Los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible incluyendo, pero sin limitación, síntesis química, síntesis enzimática, escisión enzimática o química de un precursor más largo, etc. Son conocidos en la materia procedimientos de síntesis de polímeros de ácido nucleico (p.ej., polinucleótidos) (véanse, p.ej. Gait, *M.I.* (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984 y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in molecular biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

Los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden comprender residuos de ácido nucleico de origen natural. En algunas realizaciones, los residuos de ácido nucleico de origen natural incluyen nucleósidos, nucleósidos modificados, nucleósidos de origen natural con ligadores de hidrocarburo (p.ej., un alquileo) o un ligador de poliéter (p.ej., un ligador de PEG) insertados entre uno o más nucleósidos, nucleósidos modificados con hidrocarburo o ligadores de PEG insertados entre uno o más nucleósidos, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los residuos de ácido nucleico o residuos de ácido nucleico modificados pueden reemplazarse por un ligador de hidrocarburo o ligador de poliéter a condición de que la afinidad de unión, selectividad y/u otras características funcionales de los residuos de ácido nucleico no se reduzcan sustancialmente por la sustitución.

Se apreciará por los especialistas en la técnica que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender enteramente residuos de ácido nucleico de los tipos encontrados en los ácidos nucleicos de origen natural, o pueden incluir en cambio uno o más análogos de residuo de ácido nucleico o tener una estructura que difiera de otro modo de la de un ácido nucleico de origen natural. Las patentes de EE.UU. 6.403.779, 6.399.754, 6.225.460, 6.127.533, 6.031.086, 6.005.087, 5.977.089 y referencias en las mismas divulgan una amplia variedad de análogos y modificaciones de residuos de ácido nucleico específicos que pueden usarse. Véase Crooke, S. (ed.) *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* (1ª ed), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661; 1ª edición (2001) y las referencias en el mismo. Por ejemplo, las 2'-modificaciones incluyen grupos halógeno, alcoxi y alilo. En algunas realizaciones, el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado de entre H, OR, R, halógeno, SH, SR<sub>1</sub>, NH<sub>2</sub>, NH<sub>R</sub>, NR<sub>2</sub> o CN, donde R es alquilo, alqueno o alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y halógeno es F, Cl, Br o I. Los ejemplos de ligamientos modificados incluyen ligamientos fosforotioato y 5' -N-fosforamidita.

Pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención ácidos nucleicos que comprenden una variedad de diferentes análogos de residuo de ácido nucleico (p.ej., nucleótido, nucleósido), esqueletos modificados o ligamientos internucleosídicos de origen no natural. Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosa, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosa y desoxicitidina) o nucleósidos modificados. Los ejemplos de nucleótidos modificados incluyen nucleósidos de base modificada (p.ej., aracitidina, inosina, isoguanosa, nebularina, seudouridina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, 2-tiotimidina, 3-desaza-5-azacitidina, 2'-desoxiuridina, 3-nitropirrol, 4-metilindol, 4-tiouridina, 4-tiotimidina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, 2-tiouridina, 5-bromocitidina, 5-yodouridina, inosina, 6-azauridina, 6-cloropurina, 7-desazadenosina, 7-desazaguanosina, 8-azadenosina, 8-azidoadenosina, bencimidazol, M1-metiladenosina, pirrolopirimidina, 2-amino-6-cloropurina, 3-metiladenosina, 5-propinilcitidina, 5-propiniluridina, 5-bromouridina, 5-fluorouridina, 5-metilcitidina, 7-desazadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina), bases modificadas química o biológicamente (p.ej., bases metiladas), azúcares modificados (p.ej. 2'-fluororribosa, 2'-aminorribosa, 2'-azidorribosa, 2'-O-metilribosa, los nucleósidos L-enantioméricos arabinosa y hexosa), grupos fosfato modificados (p.ej., ligamientos de fosforotioato y 5'-N-fosforamidita) y combinaciones de los mismos. Los monómeros de residuos de ácido nucleico naturales y modificados para la síntesis química de ácidos nucleicos están fácilmente disponibles. En algunos casos, los ácidos nucleicos que comprenden residuos que tienen tales modificaciones presentan propiedades mejoradas respecto a los ácidos nucleicos consistentes en solo residuos de origen natural. En algunas realizaciones, se utilizan las modificaciones de ácido nucleico descritas en la presente memoria para reducir y/o prevenir la digestión por

nucleasas (p.ej., exonucleasas, endonucleasas, etc.). Por ejemplo, la estructura de un polinucleótido puede estabilizarse incluyendo análogos nucleotídicos en el extremo 3' de una o ambas hebras para reducir la digestión.

Los ácidos nucleicos modificados (p.ej., polinucleótidos modificados) no tienen que estar modificados uniformemente a lo largo de toda la longitud del polinucleótido. Pueden existir diferentes modificaciones de residuos de ácido nucleico y/o estructuras de esqueleto en diversas posiciones del polinucleótido. Un especialista en la técnica apreciará que los análogos de residuo u otra modificación o modificaciones pueden estar localizados en cualquier posición de un polinucleótido de tal modo que la función del polinucleótido no se afecte sustancialmente. La región modificada puede estar en el extremo 5' y/o 3' de una o ambas hebras. Por ejemplo, se han empleado polinucleótidos modificados en que aproximadamente 1 a aproximadamente 5 residuos en el extremo 5' y/o 3' de cualquiera de ambas hebras son análogos de residuo y/o tienen una modificación de esqueleto. La modificación puede ser una modificación 5'- o 3'-terminal. Una o ambas hebras de ácido nucleico puede comprender al menos un 50 % de residuos no modificados, al menos un 80 % de residuos no modificados, al menos un 90 % de residuos no modificados o un 100 % de residuos no modificados.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender, por ejemplo, una modificación en un azúcar, residuo o ligamiento internucleosídico tal como los descritos en las publicaciones de patente de EE.UU. 2003/0175950, 2004/0192626, 2004/0092470, 2005/0020525 y 2005/0032733. La presente invención engloba el uso de cualquier ácido nucleico que tenga una cualquiera o más de las modificaciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se ha reseñado que una serie de conjugados terminales, p.ej. lípidos tales como colesterol, ácido litocólico, ácido alúrico o cadenas largas de alquilo ramificado, mejoran la captación celular. Los análogos y modificaciones pueden ensayarse usando, p.ej., cualquier ensayo apropiado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más ligamientos nucleosídicos no naturales. En algunas realizaciones, se invierten uno o más nucleótidos internos en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos 3' y 5' del ácido nucleico, facilitando ligamientos tales como un ligamiento 3'-3' o un ligamiento 5'-5'.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención no son sintéticos, sino entidades de origen natural que se han aislado de sus entornos naturales.

En ciertas realizaciones específicas, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención comprenden solo residuos de ácido nucleico de origen natural (p.ej., nucleótidos y/o nucleósidos). En ciertas realizaciones específicas, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención comprenden solo residuos no modificados. Las composiciones de nanopartículas de la presente invención son capaces de suministro (p.ej., suministro transdérmico) tanto de ácidos nucleicos modificados como no modificados.

Los ácidos nucleicos para uso de acuerdo con la presente invención son generalmente aquellos que tienen actividad biológica en la piel (p.ej., epidermis y dermis), tejido subcutáneo (p.ej., tejido adiposo), músculos contiguos y/o tejidos distantes (p.ej., órganos tales como pulmones, hígado, etc.).

En algunas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende un ARN funcional (p.ej., oligonucleótido anticodificante, ribozima, ARN que participa en la formación de estructuras de triple hélice, etc.). En ciertas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende una molécula anticodificante que se une a un sitio de inicio de la traducción, sitio de inicio de la transcripción y/o unión de corte y empalme. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos anticodificantes previenen la traducción o procesamiento postraduccional del ARN. Como alternativa o adicionalmente, los oligonucleótidos anticodificantes pueden alterar la transcripción de un gen diana mediante la unión a ADN de un gen diana tal como, por ejemplo, un elemento regulador.

Típicamente, los ARN anticodificantes exhiben suficiente complementariedad con un transcrito diana para permitir la hibridación del ARN anticodificante con el transcrito diana. Se toleran desapareamientos, siempre que pueda seguir apareciendo hibridación con la diana. En general, los ARN anticodificantes pueden ser de cualquier longitud, siempre que pueda seguir apareciendo hibridación. En algunas realizaciones, los ARN anticodificantes son de alrededor de 20 nt, alrededor de 30 nt, alrededor de 40 nt, alrededor de 50 nt, alrededor de 75 nt, alrededor de 100 nt, alrededor de 150 nt, alrededor de 200 nt, alrededor de 250 nt, alrededor de 500 nt o más largos. En algunas realizaciones, los ARN anticodificantes comprenden una región inhibidora que hibrida con un transcrito diana de alrededor de 20 nt, alrededor de 30 nt, alrededor de 40 nt, alrededor de 50 nt, alrededor de 75 nt, alrededor de 100 nt, alrededor de 150 nt, alrededor de 200 nt, alrededor de 250 nt, alrededor de 500 nt o más largo.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende un agente que media la interferencia de ARN (iARN). La iARN es un mecanismo que inhibe la expresión de genes específicos. La iARN inhibe típicamente la expresión génica a nivel de traducción, pero puede funcionar inhibiendo la expresión génica a nivel de transcripción. Las dianas de iARN incluyen cualquier ARN que pueda estar presente en células incluyendo, pero sin limitación, transcritos celulares, transcritos patogénicos (p.ej., de virus, bacterias, hongos, etc.), transposones, vectores, etc.

Los agentes de iARN de acuerdo con la invención pueden orientarse a cualquier porción de un transcrito. En algunas realizaciones, el transcrito diana está localizado en una secuencia codificante de un gen. En algunas

realizaciones, el transcrito diana está localizado en secuencia no codificante. En algunas realizaciones, el transcrito diana está localizado en un exón. En algunas realizaciones, el transcrito diana está localizado en un intrón. En algunas realizaciones, el transcrito diana está localizado en una región 5' no traducida (UTR) o 3' UTR de un gen. En algunas realizaciones, el transcrito diana está localizado en una región potenciadora. En algunas realizaciones, el transcrito diana está localizado en un promotor.

Para cualquier diana génica particular, el diseño de los agentes de iARN y/o agentes inductores de iARN sigue típicamente ciertas directrices. En general, es deseable evitar secciones del transcrito diana que puedan compartirse con otros transcritos cuya degradación no se desea. En algunas realizaciones, los agentes de iARN y/o entidades inductoras de iARN se orientan a transcritos diana y/o porciones de los mismos que están altamente conservados. En algunas realizaciones, los agentes de iARN y/o entidades inductoras de iARN se orientan a transcritos diana y/o porciones de los mismos que no están altamente conservados.

Como se usa en la presente memoria, un "ARN interferente pequeño" o "siARN" hace referencia a un agente de iARN que comprende un dúplex de ARN (al que se hace referencia en la presente memoria como una "región de dúplex") que es de aproximadamente 19 pares de bases (pb) de longitud y opcionalmente comprende además uno o dos salientes monocatenarios. En algunas realizaciones, un siARN comprende una región de dúplex que oscila de 15 pb a 29 pb de longitud y comprende opcionalmente además uno o dos salientes monocatenarios. Un siARN está formado típicamente por dos moléculas de ARN (es decir, dos hebras) que hibridan conjuntamente. Una hebra de siARN incluye una porción que hibrida con un transcrito diana. En algunas realizaciones, los siARN median la inhibición de la expresión génica causando la degradación de los transcritos diana.

Como se usa en la presente memoria, un "ARN de horquilla corto" o "shARN" hace referencia a un agente de iARN que comprende un ARN que tiene al menos dos porciones complementarias hibridadas o capaces de hibridar formando una estructura bicatenaria (dúplex) suficientemente larga para mediar la iARN (típicamente de al menos aproximadamente 19 pb de longitud) y al menos una porción monocatenaria, típicamente que oscila entre aproximadamente 1 nucleótido (nt) y aproximadamente 10 nt de longitud que forma un bucle. En algunas realizaciones, un shARN comprende una porción de dúplex que oscila de 15 pb a 29 pb de longitud y al menos una porción monocatenaria, típicamente que oscila entre aproximadamente 1 nt y aproximadamente 10 nt de longitud que forma un bucle. En algunas realizaciones, la porción monocatenaria es de aproximadamente 1 nt, aproximadamente 2 nt, aproximadamente 3 nt, aproximadamente 4 nt, aproximadamente 5 nt, aproximadamente 6 nt, aproximadamente 7 nt, aproximadamente 8 nt, aproximadamente 9 nt o aproximadamente 10 nt de longitud. En algunas realizaciones, los shARN se procesan hasta siARN por la maquinaria de iARN celular (p.ej., por Dicer). Por tanto, en algunas realizaciones, los shARN pueden ser precursores de siARN. Independientemente, los siARN son en general capaces de inhibir la expresión de un ARN diana de forma similar a los siARN. Como se usa en la presente memoria, el término "agente corto de iARN" se usa para hacer referencia a siARN y shARN, colectivamente.

Los agentes cortos de iARN incluyen típicamente una región de bases apareadas ("región de dúplex") de entre aproximadamente 15 nt y aproximadamente 29 nt de longitud, p.ej. de aproximadamente 19 nt de longitud, y puede tener opcionalmente uno o más extremos libres o en bucle. Los agentes inductores de iARN y/o agentes cortos de iARN incluyen típicamente una región (la "región de dúplex") en la que una hebra contiene una región inhibidora de entre 15 nt a 29 nt de longitud que es suficientemente complementaria de una porción del transcrito diana (la "porción diana"), de modo que pueda formarse un híbrido (el "núcleo central") *in vivo* entre esta hebra y el transcrito diana. El núcleo central se entiende que no incluye salientes.

En algunas realizaciones, los siARN comprenden salientes 3' en uno o ambos extremos de la región de dúplex. En algunas realizaciones, un shARN comprende un saliente 3' en su extremo libre. En algunas realizaciones, los siARN comprenden un saliente 3' de un solo nucleótido. En algunas realizaciones, los siARN comprenden un saliente 3' de 2 nt. En algunas realizaciones, los siARN comprenden un saliente 3' de 1 nt. Los salientes, si están presentes, pueden ser, pero no tienen que ser, complementarios del transcrito diana. Los siARN con salientes de 2 nt-3 nt en sus extremos 3' son frecuentemente más eficientes en la reducción de los niveles de transcrito diana que los siARN con extremos romos.

En algunas realizaciones, la región inhibidora de un agente corto de iARN es 100 % complementaria de una región de un transcrito diana. Sin embargo, en algunas realizaciones, la región inhibidora de un agente corto de iARN es menos de un 100 % complementaria de una región de un transcrito diana. La región inhibidora tiene que ser solo suficientemente complementaria de un transcrito diana de tal modo que pueda aparecer hibridación, p.ej. en condiciones fisiológicas en una célula y/o en un sistema *in vitro* que soporte iARN (p.ej., un sistema de extracto de *Drosophila*).

Un especialista en la técnica apreciará que los dúplex de agente corto de iARN pueden tolerar desapareamientos y/o protuberancias, particularmente desapareamientos en la región central del dúplex, conduciendo todavía a un silenciamiento efectivo. Un especialista en la técnica reconocerá también que puede ser deseable evitar desapareamientos en la porción central del agente corto de iARN/núcleo central del transcrito diana (véase, p.ej., Elbashir *et al.*, *EMBO J* 20: 6877, 2001). Por ejemplo, los nucleótidos 3' de la hebra anticodificante del siARN a

menudo no contribuyen significativamente a la especificidad del reconocimiento de diana y pueden ser menos críticos para la escisión de diana.

Los microARN (miARN) son ARN no codificantes codificados genómicamente de alrededor de 21-23 nucleótidos de longitud que ayudan a regular la expresión génica, particularmente durante el desarrollo (véanse, p.ej., Bartel, 2004, *Cell*, 116: 281; Novina y Sharp, 2004, *Nature*, 430: 161 y la publicación de patente de EE.UU. 2005/0059005; también revisada en Wang y Li, 2007, *Front. Biosci.*, 12: 3975 y Zhao, 2007, *Trends Biochem. Sci.*, 32: 189. El fenómeno de la interferencia de ARN, ampliamente definido, incluye los efectos de silenciamiento génico inducido endógenamente de miARN así como silenciamiento desencadenado por dsARN extraño. Los miARN maduros son estructuralmente similares a los siARN producidos a partir de dsARN exógeno, pero antes de alcanzar la madurez, los miARN experimentan primero una extensa modificación postranscripcional. Un miARN se expresa típicamente a partir de un gen codificante de ARN mucho más largo como transcrito primario conocido como primiARN, que se procesa en el núcleo celular hasta una estructura de tallo-bucle de 70 nucleótidos denominada premiARN por el complejo microprocesador. Este complejo consiste en una enzima ARNasa III denominada Drosha y una proteína de unión a dsARN Pasha. La porción de dsARN de este premiARN se une y escinde por Dicer, produciendo la molécula de miARN madura que puede integrarse en el complejo RISC; por tanto, miARN y siARN comparten la misma maquinaria celular posteriormente a su procesamiento inicial (Gregory *et al.*, 2006, *Meth. Mol. Biol.*, 342: 33. En general, los miARN no son perfectamente complementarios de sus transcritos diana.

En algunas realizaciones, los miARN pueden oscilar en el intervalo entre 18 nt-26 nt de longitud. Típicamente, los miARN son monocatenarios. Sin embargo, en algunas realizaciones, los miARN pueden ser al menos parcialmente bicatenarios. En ciertas realizaciones, los miARN pueden comprender un dúplex de ARN (al que se hace referencia en la presente memoria como una "región de dúplex") y pueden comprender opcionalmente además uno o dos salientes monocatenarios. En algunas realizaciones, un agente de iARN comprende una región de dúplex que oscila de 15 pb a 29 pb de longitud y que comprende opcionalmente además uno a tres salientes monocatenarios. Un miARN puede formarse a partir de dos moléculas de ARN que hibridan conjuntamente, o puede generarse como alternativa a partir de una sola molécula de ARN que incluye una porción de autohibridación. La porción de dúplex de un miARN comprende habitualmente, pero no necesariamente, una o más protuberancias consistentes en uno o más nucleótidos no apareados. Una hebra de un miARN incluye una porción que hibrida con un ARN diana. En ciertas realizaciones, una hebra del miARN no es exactamente complementaria de una región del ARN diana, lo que significa que el miARN hibrida con el ARN diana con uno o más desapareamientos. En algunas realizaciones, una hebra del miARN es exactamente complementaria de una región del ARN diana, lo que significa que el miARN hibrida con el ARN diana sin desapareamientos. Típicamente, se cree que los miARN median la inhibición de la expresión génica al inhibir la traducción de transcritos diana. Sin embargo, en algunas realizaciones, los miARN pueden mediar la inhibición de la expresión génica causando la degradación de los transcritos diana.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende una ribozima diseñada para escindir catalíticamente transcritos de ARNm diana que puede usarse para evitar la traducción de un ARNm diana y/o la expresión de una diana (véanse, p.ej., la publicación PCT WO 90/11364 y Sarver *et al.*, 1990, *Science* 247: 1222).

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende un ácido nucleico que participa en la formación de estructuras de triple hélice. La expresión endógena del gen diana puede reducirse orientándose a secuencias desoxirribonucleotídicas complementarias de la región reguladora del gen diana (p.ej., el promotor y/o potenciadores del gen diana), formando estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen diana en células musculares diana del cuerpo (véanse en general, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6: 569; Helene *et al.*, 1992, *Ann. NY Acad. Sci.* 660: 27 y Maher, 1992, *Bioassays* 14: 807).

En algunos aspectos, el mecanismo mediante el cual un ácido nucleico particular ejerce un efecto terapéutico y/o afecta a una actividad biológica es desconocido. La presente invención contempla el uso de tales ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, pueden usarse los procedimientos de la presente invención para el suministro (p.ej., suministro transdérmico) de ácidos nucleicos biológicamente activos (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico) que no se han identificado ni caracterizado todavía.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención mejoran la curación de heridas. Tales ácidos nucleicos incluyen ADN codificante del factor de crecimiento de queratinocitos 1 (KGF-1) (Lin *et al.*, 2006, *Wound Repair Regen.*, 14: 618). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican KGF-1 se caracterizan por toda o una porción de una secuencia como se expone en la secuencia de GenBank NC\_000015.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden promover la curación de heridas cutáneas. Tales ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos anticodificantes de Conexina43 (Cx43), agentes de iARN, siARN, shARN y/o miARN (Mori *et al.*, 2006, *J Cell Sci.*, 119: 5193). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos anticodificantes, agentes de iARN, siARN, shARN y/o miARN pueden orientarse a una o más regiones y/o porciones características de un ácido nucleico que tiene una secuencia tal como la expuesta en la secuencia de GenBank AK312324.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden suprimir la proliferación anormal de células cutáneas y potenciar la curación de heridas cutáneas. Tales nucleótidos pueden incluir nucleótidos y nucleósidos de monofosfato, nucleósidos de difosfato y nucleósidos de trifosfato. En algunas realizaciones, tales ácidos nucleicos incluyen nucleótidos de adenina y nucleósidos de adenosina y trifosfato de adenosina (Brown *et al.*, 2000, *J Invest. Dermatol.*, 115: 849 y Wang *et al.*, 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166: 251).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención estimulan la producción de interferón que inhibe la síntesis de colágeno en la piel y tiene el potencial de tratar escleroderma, una enfermedad del tejido conectivo. Tales ácidos nucleicos incluyen aquellos que codifican interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (Badea *et al.*, 2005, *J Gene Med.*, 7: 1200 y Gray y Goeddel, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80: 5842). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican IFN $\gamma$  se caracterizan por toda o una porción de una secuencia como se expone en la secuencia de GenBank NM\_001127598, NM\_000612, NM\_001007139 o NC\_000076.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención tratan el trastorno cutáneo paquioniquia congénita. Tales ácidos nucleicos incluyen siARN cuyos genes diana codifican queratina en la piel (Hickerson *et al.*, 2006, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1082: 56). En realizaciones específicas, tales siARN pueden comprender una o más de una cualquiera de las siguientes secuencias anticodificantes:

AAACUUGUUUUUGAGGGUCU (SEQ ID NO.: 1); UUUUUGAGGGUCUUGAUCU (SEQ ID NO.: 2); UUUUGAGGGUCUUGAUCUGU (SEQ ID NO.: 3); UUUGAGGGUCUUGAUCUGUU (SEQ ID NO.: 4); AAGGAGCAAACUUGUUUUU (SEQ ID NO.: 5); AACUUGUUGAGGGUCUUGAU (SEQ ID NO.: 6); AAACUUGUUGAGGGUCUUGU (SEQ ID NO.: 7) y CAAACUUGUUGAGGGUCUUU (SEQ ID NO.: 8) (Hickerson *et al.*, 2006, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1082:56).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención suprimen las rutas moleculares que causan la inflamación cutánea. Tales ácidos nucleicos incluyen oligodesoxinucleótidos de citidina-fosfato-guanosina, incluyendo dos motivos de citidina-fosfato-guanosina (CpG) (CpG-1-fosforotioato (PTO)) y un motivo de policitidina (no-CpG-5-PTO) (Pivarcsi, 2007, *J Invest. Dermatol.*, 127: 846 y Dom y col., 2007, *J Invest. Dermatol.*, 127: 746). En algunas realizaciones, tales ácidos nucleicos pueden comprender ligamientos fosforotioato. En algunas realizaciones, tales ácidos nucleicos pueden comprender una o más de cualquiera de las siguientes secuencias nucleotídicas:

TCCATGACGTTTCTGACGTT (SEQ ID NO.: 9); TCCATGACGTTTCTGACGTT (SEQ ID NO.: 10); TCCATGACGTTTCTGACGT (SEQ ID NO.: 11); TCCATGACGTTTCTGACG (SEQ ID NO.: 12); TCCTCGAGTCCCTGA (SEQ ID NO.: 13); CATGACGTTTCT (SEQ ID NO.: 14); GACGTT (SEQ ID NO.: 15) y AACGTCAGAACGTCATGGA (SEQ ID NO.: 16) (Pivarcsi, 2007, *J Invest. Dermatol.*, 127: 846 y Dom *et al.*, 2007, *J Invest. Dermatol.*, 127: 746).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden reducir la producción de VEGF en la piel, lo que podría tener efectos terapéuticos antiangiogénicos para afecciones tales como la psoriasis. Tales ácidos nucleicos incluyen un oligodesoxinucleótido de fosforotioato anticodificante de 19 unidades (complementario de las bases 6-24 respecto al sitio de inicio de la traducción del ARNm de VEGF/VPF) (Smyth *et al.*, 1997, *J Invest. Dermatol.*, 108: 523). En realizaciones específicas, tales ácidos nucleicos pueden comprender una o más de una cualquiera de las siguientes secuencias nucleotídicas anticodificantes:

CACCCAAGACAGCAGAAAG (SEQ ID NO.: 17); CTCCAAGACAGCAGAAAG (SEQ ID NO.: 18); CTGCCAAGACAGCAGAAAG (SEQ ID NO.: 19); CACCAACTCTCCAGAAAG (SEQ ID NO.: 20); CACCCAAGACAGCAGAATG (SEQ ID NO.: 21) y CACCCAAGACAGCAGATTG (SEQ ID NO.: 22) (Smyth *et al.*, 1997, *J Invest. Dermatol.*, 108: 523).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden mejorar la tasa de reparación de ADN de piel dañada por radiación UV (p.ej., radiación UV por exposición al sol y/o quemadura solar). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden prevenir o retardar el inicio de cáncer de piel. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden estimular la producción de melanocitos dando como resultado el bronceado de la piel. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden conseguir la apariencia de bronceado de la piel. Tales ácidos nucleicos pueden incluir secuencias de dipirimidina (p.ej., TT, TC, CT, CC). En algunas realizaciones, tales ácidos nucleicos incluyen dinucleótido de timidina (pTT), oligonucleótidos de ADN sustancialmente homólogos de la secuencia de saliente 3' telomérica y un oligonucleótido de 9 bases 5'-fosforilado (p9mer). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden tratar diversas clases de cáncer (p.ej., cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de ovario, melanoma, gliomas, etc.). Tales ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos sustancialmente homólogos de la secuencia de saliente 3' telomérica. En realizaciones específicas, la secuencia de saliente 3' telomérica comprende una o más de las siguientes secuencias: TTAGGG (SEQ ID NO.: 23); GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO.: 24); GGTTAGGTGTAGGTTT (SEQ ID NO.: 25); GTTAGGGTT (SEQ ID NO.: 26); TTAGGGTTA (SEQ ID NO.: 27); GTTAGGTTTAAGGTT (SEQ ID NO.: 28); GGTAGGTGTAGGGTG (SEQ ID NO.: 29); GGTCGGTGTGGGGTG (SEQ

ID NO.: 30); GGCAGGCGCAGGGCG (SEQ ID NO.: 31); GTTAGGGTTAGGGTT (SEQ ID NO.: 32); GATAAGGGATTGGGAT (SEQ ID NO.: 33); GAGTATGAG (SEQ ID NO.: 34); GGGTTAGGG (SEQ ID NO.: 35); GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO.: 36); GGTAGGTGTAGGATT (SEQ ID NO.: 37); GGTAGGTGTAGGATTT (SEQ ID NO.: 38); GGTTAGGTGTAGGTTT (SEQ ID NO.: 39); GGTTAGGTGGAGGTTT (SEQ ID NO.: 40); GGTTAGGTTTAGGTTT (SEQ ID NO.: 41); GGTTAGGTTAAGGTTA (SEQ ID NO.: 42); GGTAGGTGTAGGGTG (SEQ ID NO.: 43); GTTAGGGTTAGGGTTA (SEQ ID NO.: 44); GGTTGGTTGGTTGGTT (SEQ ID NO.: 45); CCTTGGTTGGTTGGTTGGTT (SEQ ID NO.: 46) y GGTTGGTTGGTTGGTTGGTT (SEQ ID NO.: 47). En realizaciones específicas, el p9mer comprende la siguiente secuencia nucleotídica: pGAGTATGAG (SEQ ID NO.: 34) (Goukassian *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101: 3933; Arad *et al.*, 2006, *FASEB J*, 20: 1895; Yaar *et al.*, 2007, *Breast Cancer Res.*, 9: R13; Goukassian *et al.*, 2002, *FASEB J*, 16: 754 y Ohashi *et al.*, 2007, *J Cell. Physiol.*, 210: 582).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para usar de acuerdo con la presente invención pueden tratar cáncer de piel de melanoma (p.ej., cáncer de piel de melanoma metastásico). Tales ácidos nucleicos incluyen un oligonucleótido activador del receptor 9 de tipo toll (Pashenkov *et al.*, 2006, *J Clin. Oncol.*, 24: 5716). En realizaciones específicas, tales ácidos nucleicos pueden comprender la siguiente secuencia nucleotídica: TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO.: 48) (Pashenkov *et al.*, 2006, *J Clin. Oncol.*, 24: 5716).

En algunas realizaciones, puede usarse de acuerdo con la presente invención una secuencia de ácido nucleico que es homóloga de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico se considera que son "homólogas" entre sí si comprenden menos de 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 o 1 sustituciones de ácido nucleico respectivas entre sí. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico se considera que son "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos un 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico se considera que son "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos un 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % similares.

#### Otros componentes

Como se indica en la presente memoria, las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención pueden contener o estar combinadas con uno o más de otros componentes. Se discuten aquí ciertos tales otros componentes ejemplares.

#### Agentes biológicamente activos

Se apreciará que las composiciones de nanopartículas de la presente invención pueden emplearse en terapias de combinación. La combinación particular de terapias (productos terapéuticos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se desee conseguir. Se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado con el mismo fin (por ejemplo, una composición de nanopartículas útil para tratar tumores puede administrarse simultáneamente a otro agente útil para tratar tumores), o pueden conseguir efectos diferentes (p.ej., el control de cualquier efecto adverso).

Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para suministro conjunto. Las composiciones pueden administrarse simultáneamente a, antes de o después de uno o más de otros productos terapéuticos o procedimientos médicos deseados. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un momento programado determinado para ese agente. Adicionalmente, el suministro de composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que puedan mejorar su biodisponibilidad, reducir y/o modificar su metabolismo, inhibir su excreción y/o modificar su distribución en el cuerpo.

La combinación particular de terapias (productos terapéuticos y/o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o procedimientos deseados y/o el efecto terapéutico que se desee conseguir. Se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, una composición de nanopartículas puede administrarse simultáneamente con otro agente terapéutico usado para tratar el mismo trastorno) y/o pueden conseguir efectos diferentes (p.ej., control de cualquier efecto adverso). En algunas realizaciones, se administran las composiciones de nanopartículas de la invención con un segundo agente terapéutico que está aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de EE.UU.

Se apreciará además que los agentes terapéuticamente activos utilizados "en combinación" pueden administrarse conjuntamente en una sola composición o administrarse separadamente en diferentes composiciones. Por ejemplo, la presente invención proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden un ácido nucleico y un segundo agente biológicamente activo para suministrar. La presente invención proporciona también una composición que comprende una población de nanopartículas que comprenden un ácido nucleico para suministrar y una segunda población de nanopartículas que comprenden otro agente biológicamente activo para

suministrar. La presente invención proporciona también una composición que comprende nanopartículas que comprenden un ácido nucleico para suministrar y una segunda composición que comprende nanopartículas que comprenden otro agente biológicamente activo para suministrar.

5 En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilizarán a niveles que no superen los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación serán menores que los utilizados individualmente.

10 Puede suministrarse cualquier agente biológicamente activo, por ejemplo agentes terapéuticos, de diagnóstico, profilácticos, nutricionales, cosméticos y/o dermatológicos, en combinación con ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Para dar solo unos pocos ejemplos, tales agentes biológicamente activos pueden ser moléculas pequeñas, compuestos organometálicos, ácidos nucleicos, proteínas (incluyendo proteínas multiméricas, complejos proteicos, etc.), péptidos, lípidos, carbohidratos, hierbas, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc. y/o combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones, el porcentaje de agente biológicamente activo en la composición usado para preparar nanopartículas (p.ej. en la premezcla) y/o en las nanopartículas oscila de 0,1 %-25 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agente biológicamente activo oscila de 0,1 %-20 %, de 0,1 %-15 %, de 0,1 %-10 %, de 0,1 %-5 % o de 0,1 %-1 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agente biológicamente activo oscila de 1 %-20 %, de 5 %-20 %, de 10 %-20 %, de 15 %-20 % o de 15 %-25 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agente biológicamente activo es menor de 0,1 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agente biológicamente activo es mayor de 25 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de agente biológicamente activo es de aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %  
20 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 % o mayor.

30 Los agentes biológicamente activos relevantes pueden producirse u obtenerse de acuerdo con cualquier procedimiento o enfoque disponible. Los agentes biológicamente activos pueden contener, o modificarse para contener, uno o más restos que se pretende que faciliten su uso o suministro junto con nanopartículas de acuerdo con la invención. Dicha modificación no debería interferir con la actividad biológica del agente. En algunas realizaciones, la modificación puede retirarse opcionalmente *in vivo*. Por ejemplo, los agentes biológicamente activos pueden marcarse detectablemente y/o pueden proporcionarse en forma "pro" que, después del suministro, se convierte en o modifica a una forma activa.

40 En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo es una molécula pequeña y/o compuesto orgánico con actividad farmacéutica. En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo es un fármaco usado clínicamente. En algunas realizaciones, el fármaco es un antibiótico, agente antivírico, anestésico, anticoagulante, agente anticanceroso, inhibidor de una enzima, agente esteroideo, agente antiinflamatorio, agente antineoplásico, antígeno, vacuna, anticuerpo, descongestivo, antihipertensivo, sedante, agente de control de la natalidad, agente progestacional, anticolinérgico, analgésico, antidepresivo y antipsicótico, agente bloqueante  $\beta$ -adrenérgico, diurético, agente activo cardiovascular, agente vasoactivo, agente antiinflamatorio no esteroideo, etc. Son de interés particular agentes biológicamente activos para administración transdérmica.

50 Los agentes biológicamente activos suministrados pueden ser una mezcla de agentes farmacéuticamente activos. Por ejemplo, puede suministrarse un anestésico local en combinación con un agente antiinflamatorio tal como un esteroide. Los anestésicos locales pueden administrarse también con agentes vasoactivos tales como epinefrina. Para dar solo otro ejemplo, puede combinarse un antibiótico con un inhibidor de la enzima producida comúnmente por bacterias para inactivar el anticuerpo (p.ej., penicilina y ácido clavulánico).

55 En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo es un agente de diagnóstico. En algunas realizaciones, los agentes de diagnóstico incluyen gases; agentes de imagenología disponibles comercialmente usados en tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía asistida por ordenador (CAT), tomografía computerizada por emisión de fotón único, rayos X, fluoroscopio e imagenología de resonancia magnética (MRI) y agentes de contraste. Los ejemplos de materiales adecuados para uso como agentes de contraste en MRI incluyen quelatos de gadolinio, así como de hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo. Los ejemplos de materiales útiles para imagenología de CAT y rayos X incluyen materiales basados en yodo.

65 En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo es un agente profiláctico. En algunas realizaciones, los agentes profilácticos incluyen vacunas. Las vacunas pueden comprender proteínas o péptidos aislados, organismos y virus inactivados, organismos y virus muertos, organismos o virus alterados genéticamente y extractos celulares. Los agentes profilácticos pueden combinarse con interleucinas, interferón, citocinas y coadyuvantes tales como toxina del cólera, alúmina, coadyuvante de Freund, etc. Los agentes profilácticos pueden incluir antígenos de

organismos bacterianos tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Leptospirosis interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Camphylobacter jejuni* y similares; antígenos de virus tales como viruela, gripe A y B, virus respiratorio sincitial, paragripe, sarampión, VIH, varicela zóster, herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, rotavirus, rinovirus, adenovirus, papilomavirus, poliovirus, paperas, rabia, rubeola, virus de coxsackie, encefalitis equina, encefalitis japonesa, fiebre amarilla, fiebre del valle del Rift, virus de la hepatitis A, B, C, D y E y similares; antígenos de organismos fúngicos, protozoarios y parasitarios tales como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nocardia asteroides*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni* y similares. Estos antígenos pueden estar en forma de organismos muertos enteros, péptidos, proteínas, glicoproteínas, carbohidratos o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo puede ser una proteína. Como se usa en la presente memoria, los términos “proteína” y “péptido” pueden usarse intercambiamente. En ciertas realizaciones, los péptidos oscilan de alrededor de 5 a alrededor de 100, de alrededor de 10 a alrededor de 75, de alrededor de 10 a alrededor de 50, de alrededor de 10 a alrededor de 40, de alrededor de 10 a alrededor de 35, de alrededor de 15 a alrededor de 30 o de alrededor de 20 a alrededor de 25 aminoácidos de tamaño. Pueden usarse péptidos de paneles de péptidos que comprenden secuencias aleatorias y/o secuencias que se han variado consistentemente para proporcionar un panel máximamente diverso de péptidos.

En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo puede ser un anticuerpo. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos (p.ej., “humanizados”) o monocatenarios (recombinantes). En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden tener funciones efectoras reducidas y/o moléculas biespecíficas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir fragmentos Fab y/o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab.

En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo es un agente nutracéutico. En algunas realizaciones, el agente nutracéutico proporciona un valor nutricional básico. En algunas realizaciones, el agente nutracéutico proporciona beneficios sanitarios o médicos. En algunas realizaciones, el agente nutracéutico es un suplemento dietético.

En algunas realizaciones, el agente nutracéutico es una vitamina. En algunas realizaciones, la vitamina es una o más de vitamina A (retinoides), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (píridoxina), vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (ácido fólico), vitamina B12 (cianocobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D, vitamina E o vitamina K.

En algunas realizaciones, el agente nutracéutico es un mineral. En algunas realizaciones, el mineral es uno o más de bismuto, boro, calcio, cloro, cromo, cobalto, cobre, flúor, yodo, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, fósforo, potasio, rubidio, selenio, silicio, sodio, estroncio, azufre, telurio, titanio, wolframio, vanadio o zinc.

En algunas realizaciones, el agente nutracéutico es un aminoácido esencial. En algunas realizaciones, el aminoácido es uno o más de arginina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano o valina.

En algunas realizaciones, los agentes nutracéuticos pueden incluir ácidos grasos y/o ácidos grasos omega 3 (p.ej., DHA o ARA), extractos de frutas y verduras, luteína, fosfatidilserina, ácido lipoico, melatonina, glucosamina, condroitina, aloe vera, guggul, té verde, licopeno, alimentos completos, aditivos alimentarios, hierbas, fitonutrientes, antioxidantes, constituyentes flavonoides de frutas, aceite de onagra vespertina, semilla de lino, aceites de pescado y animales marinos (p.ej., aceite de hígado de bacalao) y probióticos. En algunas realizaciones, los agentes nutracéuticos pueden incluir alimentos biomanipulados genomanipulados para tener una propiedad deseada (también conocidos como “farmacoalimentos”).

Se divulgan agentes nutracéuticos y suplementos dietéticos ejemplares, por ejemplo, en Roberts *et al.*, (*Nutraceuticals: The Complete Encyclopedia of Supplements, Herbs, Vitamins, and Healing Foods*, American Nutraceutical Association, 2001). Se divulgan también agentes nutracéuticos y suplementos dietéticos en *Physicians' Desk Reference for Nutritional Supplements*, 1ª Ed. (2001) y *The Physicians' Desk Reference for Herbal Medicines*, 1ª Ed. (2001).

En algunas realizaciones, las nanopartículas de acuerdo con la invención cargadas con agentes nutracéuticos pueden incorporarse a sustancias alimentarias. Por ejemplo, las nanopartículas cargadas con nutracéuticos pueden disolverse en líquidos tales como bebidas.

En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo es un agente cosmético y/o dermatológico. En algunas realizaciones, el agente cosmético y/o dermatológico puede incluir vitaminas y sus derivados (p.ej., vitamina E y sus ésteres, vitamina C y sus ésteres, vitaminas B, alcohol o retinol de vitamina A y sus ésteres), provitaminas (p.ej., pantenol, niacinamida o ergocalciferol), antioxidantes, compuestos fenólicos (p.ej., peróxido de benzoílo), aceites esenciales, humectantes, agentes protectores solares, agentes humidificantes, proteínas, ceramidas y seudoceramidas.

En algunas realizaciones, un agente biológicamente activo para suministrar con ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención puede ser uno o más complejos peptídicos o proteicos de toxina botulínica. En general, toxina botulínica hace referencia a cualquier neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*. En algunas realizaciones, la toxina botulínica puede ser una o más de toxina botulínica de serotipos A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E, F o G. En algunas realizaciones, toxina botulínica puede hacer referencia a un complejo de toxina botulínica (por ejemplo, complejos de 300 kDa, 600 kDa y 900 kDa) así como a toxina botulínica purificada (por ejemplo aislada) (por ejemplo de alrededor de 150 kDa). En algunas realizaciones, la toxina botulínica puede ser una toxina botulínica aislada y/o purificada. En algunas realizaciones, la toxina botulínica puede ser una toxina botulínica parcialmente aislada y/o parcialmente purificada. En algunas realizaciones, la toxina botulínica puede ser un complejo botulínico nativo. En algunas realizaciones, la toxina botulínica puede estar asociada a proteínas no toxinas. En algunas realizaciones, la toxina botulínica puede ser una toxina botulínica preparada recombinantemente.

En algunas realizaciones, el agente biológicamente activo puede ser uno o más agentes terapéuticos usados en el tratamiento del cáncer (p.ej., agentes quimioterapéuticos). En realizaciones específicas, el agente anticanceroso biológicamente activo para suministrar con ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención puede ser un agente citotóxico. La mayoría de agentes anticancerosos pueden dividirse en las siguientes categorías: agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales y hormonas y antagonistas. Cualquiera de los agentes anticancerosos discutidos en la presente memoria puede suministrarse en combinación con ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Puede usarse tal terapia de combinación para tratar cualquier tipo de cáncer.

Los agentes anticancerosos afectan típicamente a la división celular y/o a la síntesis de ADN. Sin embargo, algunos agentes quimioterapéuticos no interfieren directamente con el ADN. Para dar solo un ejemplo, los inhibidores de tirosina cinasa (mesilato de imatinib/GLEEVEC<sup>®</sup>) se orientan directamente a una anomalía molecular en ciertos tipos de cáncer (leucemia mielógena crónica, tumores estromales gastrointestinales, etc.).

Los agentes alquilantes se denominan así debido a su capacidad de añadir grupos alquilo a muchos grupos electronegativos en las condiciones presentes en las células. Los agentes alquilantes funcionan típicamente modificando químicamente el ADN celular. Los agentes alquilantes ejemplares incluyen mostazas nitrogenadas (p.ej., mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (l-sarcolisina), clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (p.ej., altretamina (hexametilmelamina; HMM), tiotepa (tiofosforamida de trietileno), trietilenmelamina (TEM)), alquilsulfonatos (p.ej. busulfán), nitrosoureas (p.ej., carmustina (BCNU), lomustina (CCMU), semustina (metil-CCNU), estreptozocina (estreptozotocina)) y triazenos (p.ej., dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida)).

Los antimetabolitos actúan imitando metabolitos de molécula pequeña (p.ej., ácido fólico, pirimidinas y purinas) para incorporarse a ADN celular recién sintetizado. Tales agentes afectan también a la síntesis de ARN. Es un análogo de ácido fólico ejemplar el metotrexato (ametopterina). Los análogos de pirimidina ejemplares incluyen fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina). Los análogos de purina ejemplares incluyen mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), azatioprina, tioguanina (6-tioguanina; TG), fosfato de fludarabina, pentostatina (2'-desoxicoformicina), cladribina (2-clorodesoxiadenosina; 2-CdA) y eritrohidroxinoniladenina (EHNA).

Los productos de molécula pequeña naturales que pueden usarse como agentes anticancerosos incluyen alcaloides vegetales y antibióticos. Los alcaloides y terpenoides vegetales (p.ej., alcaloides de vinca, podofilotoxina, taxanos, etc.) bloquean típicamente la división celular al prevenir la función de microtúbulos. Los alcaloides de vinca (p.ej., vincristina, vinblastina (VLB), vinorelbina, vindesina, etc.) se unen a tubulina e inhiben el ensamblaje de tubulina en microtúbulos. Los alcaloides de vinca derivan de la vinca de Madagascar *Catharanthus roseus* (antiguamente conocida como *Vinca rosea*). La podofilotoxina es un compuesto derivado de plantas usado para producir otros dos agentes terapéuticos citostáticos, etopósido y tenipósido, que previenen que las células entren en las fases G1 y S del ciclo celular. La podofilotoxina se obtiene principalmente de manzano de mayo americano (*Podophyllum peltatum*) y manzano de mayo del Himalaya (*Podophyllum hexandrum*). Los taxanos (p.ej., paclitaxel, docetaxel, etc.) derivan del tejo. Los taxanos potencian la estabilidad de microtúbulos, evitando la separación de cromosomas durante la anafase.

Los antibióticos que pueden usarse como agentes anticancerosos incluyen dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, idarubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C).

Otras moléculas pequeñas que pueden usarse como agentes anticancerosos incluyen complejos de coordinación de platino (p.ej., cisplatino (cis-DDP), carboplatino), antracenediona (p.ej., mitoxantrona), urea sustituida (p.ej., hidroxiiurea), derivados de metilhidrazina (p.ej., procarbazona (N-metilhidrazina, MIH) y supresores adrenocorticales (p.ej., mitotano (*o,p'*-DDD), aminoglutetimida).

Las hormonas que pueden usarse como agentes anticancerosos incluyen adrenocorticosteroides (p.ej., prednisona), aminoglutetimida, progestinas (p.ej., caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol), estrógenos (p.ej., dietilestilbestrol, etinilestradiol), antiestrógenos (p.ej., tamoxifeno), andrógenos (propionato de testosterona, fluoximesterona), antiandrógenos (p.ej., flutamida) y análogo de hormona liberadora de gonadotropina (p.ej., leuprolida).

Los inhibidores de topoisomerasa actúan inhibiendo la función de las topoisomerasas, que son enzimas que mantienen la topología del ADN. La inhibición de topoisomerasas de tipo I o tipo II interfiere tanto con la transcripción como con la replicación de ADN al perturbar el superenrollamiento apropiado del ADN. Algunos inhibidores de topoisomerasa de tipo I ejemplares incluyen camptotecinas (p.ej., irinotecán, topotecán, etc.). Algunos inhibidores de topoisomerasa de tipo II ejemplares incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, etc., que son derivados semisintéticos de epipodofilotoxinas, discutidas en la presente memoria.

En realizaciones específicas, el agente anticanceroso biológicamente activo puede ser un agente inmunoterapéutico. La inmunoterapia es el uso de mecanismos inmunitarios contra tumores que pueden usarse en diversas formas de cáncer, tales como cáncer de mama (p.ej., trastuzumab/HERCEPTIN<sup>®</sup>), leucemia (p.ej., gemtuzumab ozogamicina/MYLOTARG<sup>®</sup>) y linfoma no de Hodgkin (p.ej., rituximab/RITUXAN<sup>®</sup>). En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia son anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas que son características de las células del cáncer en cuestión. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia son citocinas que modulan la respuesta del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia pueden ser vacunas (p.ej., una vacuna de HPV usada para la profilaxis del cáncer cervicouterino).

Los especialistas en la técnica reconocerán que esta es una lista ejemplar, no integral, de agentes biológicamente activos que pueden suministrarse en combinación con ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Puede encapsularse cualquier agente biológicamente activo o unirse a la superficie de nanopartículas de acuerdo con la invención. Puede encontrarse un listado más completo de las clases y fármacos específicos adecuados para uso en la presente invención en *Pharmaceutical Drugs: Syntheses, Patents, Applications* de Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 y en *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Ed. por Budavari et al., CRC Press, 1996.

#### Agentes retardantes de la liberación.

En algunas realizaciones, particularmente aquellas que contienen uno o más agentes biológicamente activos (p.ej., ácidos nucleicos), las composiciones de nanopartículas incluyen además o se formulan con uno o más ingredientes retardantes de la liberación para permitir una liberación controlada del agente. Cualquier agente retardante de la liberación conocido en la técnica es adecuado para uso en la preparación de nanopartículas. En algunas realizaciones, los ingredientes retardantes de la liberación son polímeros hidrófilos y/o hidrófobos. Los ingredientes retardantes de la liberación incluyen, por ejemplo, celulosas o derivados de las mismas, polímeros acrílicos, polímeros de éster, polímeros basados en vinilpirrolidona, gomas, otros polímeros naturales y/o combinaciones de estos.

En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación es celulosa o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la celulosa o derivado de la misma comprende uno o más de hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa. En ciertas realizaciones, la celulosa o derivado de la misma es metilcelulosa o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la celulosa o derivado de la misma es hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Los especialistas en la técnica apreciarán que pueden utilizarse otros polímeros celulósicos, incluyendo otros polímeros alquilcelulósicos.

En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación es un polímero acrílico. En ciertas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida del ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(anhídrido del ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación es un poliéster. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen polialquilenglicoles, poli(glicolida-co-lactida), copolímero de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)-

PEG, poli(ácido láctico), copolímero de poli(ácido láctico)-PEG, poli(ácido glicólico), copolímero de poli(ácido glicólico)-PEG, copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, polianhídridos, poli(ortoésteres), copolímero de poli(ortoéster)-PEG, poli(caprolactona), copolímero de poli(caprolactona)-PEG, polilisina, copolímero de polilisina-PEG, poli(etilenimina), copolímero de poli(etilenimina)-PEG y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, policaprolactona, poli-(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido  $\alpha$ -(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación es un polímero reticulado de polivinilpirrolidona. En algunas realizaciones, el polímero es crospovidona. En algunas realizaciones, el polímero es polivinilpirrolidona no reticulada. En algunas realizaciones, el polímero es povidona.

En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación puede ser un polímero natural. En algunas realizaciones, el polímero natural es una goma incluyendo, por ejemplo, goma de xantano, ácido algínico, goma de caraya, alginato de sodio y/o goma de algarrobo. En algunas realizaciones, el polímero natural puede ser una proteína (p.ej., albúmina), lípido, ácido nucleico o carbohidrato, y el ingrediente retardante de la liberación puede ser un poliéster.

En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación es un polímero reticulado de polivinilpirrolidona. En algunas realizaciones, el polímero es crospovidona. En algunas realizaciones, el polímero es polivinilpirrolidona no reticulada. En algunas realizaciones, el polímero es povidona. En algunas realizaciones, el ingrediente retardante de la liberación puede ser un polímero natural. En algunas realizaciones, el polímero natural es una goma incluyendo, por ejemplo, goma de xantano, ácido algínico, goma de caraya, alginato de sodio y/o goma de algarrobo. En algunas realizaciones, el polímero natural puede ser una proteína (p.ej., albúmina), lípido, ácido nucleico o carbohidrato.

#### Agentes de formulación

Las composiciones de nanopartículas de acuerdo con la invención pueden formularse para administración a un sujeto. En ciertas realizaciones, las composiciones de nanopartículas se formulan para aplicación a la piel, para conseguir el suministro (p.ej. suministro transdérmico) al sujeto. Por ejemplo, las composiciones de nanopartículas pueden formularse en preparaciones cosméticas u otras que se pretenden aplicar tópicamente.

La piel humana comprende dermis y epidermis. La epidermis tiene varias capas de tejido, a saber, estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal (identificadas en orden desde la superficie externa de la piel hacia dentro). El estrato córneo presenta el obstáculo más significativo en el suministro transdérmico de medicaciones generalmente, y presuntamente de ácidos nucleicos (p.ej., polinucleótidos modificados o no modificados y/o residuos de ácido nucleico tales como nucleótidos y/o nucleósidos) en particular. El estrato córneo es típicamente de alrededor de 10  $\mu\text{m}$  a alrededor de 15  $\mu\text{m}$  de grosor, y consiste en células queratinizadas aplanadas (corneocitos) dispuestas en varias capas. El espacio intercelular entre los corneocitos se rellena con estructuras lipídicas, y puede desempeñar un papel importante en la permeación de sustancias a través de la piel (Bauerova *et al.*, 2001, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26: 85).

El resto de la epidermis por debajo del estrato córneo es de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de grosor. La dermis es de alrededor de 1 mm a alrededor de 2 mm de grosor y está localizada por debajo de la epidermis. La dermis está inervada por diversos capilares así como procesos neuronales.

Tradicionalmente, los intentos de administración transdérmica de medicación se han centrado en aumentar la permeabilidad del estrato córneo. Algunos intentos han incluido el uso de agentes potenciadores químicos que aumentan la permeabilidad de moléculas a través de la piel. Algunos intentos han incluido el uso de aparatos mecánicos para superar o extirpar porciones del estrato córneo. Algunos intentos han incluido el uso de agentes abrasivos químicos o mecánicos que aumentan la permeabilidad de la piel. Además, algunos intentos han incluido el uso de ultrasonidos o iontoforesis para facilitar la permeación de productos farmacéuticos a través de la piel. En la mayoría de casos, el objetivo ha sido un agente farmacéutico, típicamente una molécula pequeña, a través de la piel, típicamente de tal modo que el agente pueda pasar al lecho capilar en la dermis, donde el agente puede incorporarse sistémicamente al sujeto para conseguir un efecto terapéutico.

La presente invención proporciona, entre otras cosas, procedimientos de administración de ácidos nucleicos no modificados o modificados (p.ej., polinucleótidos y/o residuos de ácido nucleico, tales como nucleótidos y/o nucleósidos) por vía transdérmica que no requieren el uso de agentes abrasivos u otros disruptores (tanto químicos como mecánicos, eléctricos, magnéticos, etc.). En lugar de ello, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que incluso moléculas grandes (p.ej., toxina botulínica) incorporadas a composiciones de nanopartículas se suministran efectivamente por vía transdérmica sin etapas adicionales para permeabilizar o perturbar el estrato córneo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos de administración de ácidos nucleicos mediante la aplicación tópica de una composición de nanopartículas de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se aplica una composición de nanopartículas directamente a la piel y para absorción a través de las capas epidérmicas. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas puede penetrar la capa superior de la piel, incluyendo estrato córneo, poros dérmicos y/o glándulas dérmicas, sin el uso de potenciadores de la permeación cutánea químicos o mecánicos u otros agentes que causen abrasión.

Se apreciará por los especialistas en la técnica que las composiciones de nanopartículas para administración tópica pueden prepararse en forma de una formulación cosmética tal como un suavizante cutáneo, emulsión de tipo loción nutritiva, loción limpiadora, crema limpiadora, leche cutánea, loción emoliente, crema de masaje, crema emoliente, base de maquillaje, lápiz de labios, paquete facial o gel facial, formulación limpiadora tal como champús, acondicionadores, limpiadores corporales, tónicos capilares o jabones o una composición dermatológica tales como lociones, pomadas, geles, cremas, parches o pulverizadores.

Tal formulación de composiciones de nanopartículas incluye típicamente la combinación con uno o más excipientes tales como, por ejemplo, cargas, agentes secuestrantes, suavizantes, materiales colorantes (p.ej., pigmentos y tintes) y fragancias.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas se formulan en forma de una crema. El término "crema" hace referencia a una composición extensible, formulada típicamente para aplicación a la piel. Las cremas contienen típicamente un aceite y/o una matriz basada en ácido graso. Las cremas formuladas de acuerdo con la presente invención pueden contener nanopartículas y pueden ser capaces de completar sustancialmente la penetración (p.ej., de tales nanopartículas) a través de la piel tras administración tópica. Tal crema podría actuar también como vehículo para los materiales incorporados (p.ej., para un ácido nucleico).

Los especialistas en la técnica apreciarán que las composiciones de nanopartículas pueden incorporarse a un dispositivo tal como, por ejemplo, un parche.

Son conocidas en la técnica una variedad de estructuras de parche transdérmico; los especialistas en la técnica apreciarán que las composiciones de nanopartículas pueden incorporarse fácilmente a cualquiera de una variedad de tales estructuras. En algunas realizaciones, un parche transdérmico puede comprender además una pluralidad de agujas que se extienden desde el lado del parche que está aplicado a la piel, donde las agujas se extienden desde el parche proyectándose a través del estrato córneo de la piel. En algunas realizaciones, las agujas no perforan un vaso sanguíneo.

En algunas realizaciones de la presente invención, puede proporcionarse una composición de nanopartículas en un depósito de un parche de modo que la presión aplicada al parche cause que los ácidos nucleicos se dirijan fuera del parche (opcionalmente a través de las agujas) y a través del estrato córneo.

En algunas realizaciones de la presente invención, un parche transdérmico incluye un adhesivo. Son bien conocidos algunos ejemplos de parches adhesivos (por ejemplo, véanse la patente de diseño de EE.UU. 296.006 y las patentes de EE.UU. 6.010.715, 5.591.767, 5.008.110, 5.683.712, 5.948.433 y 5.965.154). Los parches adhesivos se caracterizan generalmente por tener una capa adhesiva, que se aplicará a la piel de una persona, un depósito o reservorio para mantener un agente farmacéutico y una superficie exterior que prevenga la fuga del producto farmacéutico del depósito. La superficie exterior del parche es típicamente no adhesiva.

Los especialistas en la técnica apreciarán que un parche transdérmico es solo un ejemplo de un dispositivo con el que pueden administrarse composiciones de nanopartículas. Para dar solo unos pocos de otros ejemplos, puede emplearse un dispositivo que permita aplicar la composición sin aplicar primero la composición a los dedos, lo que puede conducir a un efecto biológico indeseable sobre los dedos. Los dispositivos adecuados incluyen espátulas, torundas, jeringas sin agujas y parches adhesivos. El uso de espátulas o torundas o similares puede requerir insertar el dispositivo en un recipiente que contiene la composición. El uso de jeringas puede lograrse rellenando la jeringa con la composición. La composición puede extenderse tópicamente entonces por las espátulas o torundas, o puede expulsarse de las jeringas sobre la piel del paciente.

En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar el suministro de ácidos nucleicos a solo el área de suministro pretendida. En algunas realizaciones, puede lograrse tal suministro limitado utilizando una composición de nanopartículas en un dispositivo de aplicación que permita la aplicación de la composición a un sitio diana de la piel sin aplicar la composición a áreas de sitio no diana de la piel. Claramente, puede utilizarse con este fin un parche transdérmico. Como alternativa o adicionalmente, si se van a aplicar ácidos nucleicos tópicamente sobre solo un área seleccionada, pueden cubrirse las demás áreas o pretratarse o protegerse de otro modo de la exposición.

Como alternativa o adicionalmente, las composiciones de nanopartículas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier otro medio adecuado incluyendo, pero sin limitación, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal o infusión. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la presente invención pueden administrarse mediante inyección intraarterial,

inyección intraventricular o inyección intratecal. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, interdérmica, rectal, vaginal, mucosal, nasal, bucal, entérica o sublingual. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la presente invención pueden administrarse por instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; y/o como pulverizador oral, pulverizador nasal y/o aerosol.

#### Ejemplificación

Se pretende que los siguientes ejemplos solo proporcionen ilustraciones de realizaciones específicas contempladas por la presente invención. No se pretende que los ejemplos sean limitantes en modo alguno.

#### *Ejemplo 1: Formulación de nanopartículas de adenosina*

La adenosina es un nucleótido que es conocido por tener actividad biológica sobre estructuras cutáneas (Brown *et al.*, 2000, *J Investig. Dermatol.*, 115: 849). Se preparó una composición de nanopartículas de adenosina formando una nanoemulsión. Brevemente, se agitaron 800 g de aceite de triglicérido de cadena media 1349 y 800 g de TWEEN<sup>®</sup>80 en un vial estéril durante 5 minutos. Se añadieron 14 mg de adenosina (en 84 ml de agua) a la mezcla de aceite-TWEEN<sup>®</sup> y se agitó durante 20 minutos. Se homogeneizó la muestra durante 1 minuto y se agitó entonces durante 20 minutos. Se microfluidificó la muestra una vez a 23.000 psi.

Se evaluó en la nanoemulsión de adenosina resultante el tamaño de partícula usando el calibrador de partículas Malvern Nano S, capaz de dimensionar partículas de entre alrededor de 0,6 nm-6 µm. Las nanopartículas formadas tenían un tamaño medio de 75,9 nm de diámetro. Las nanopartículas tenían un potencial zeta medio de -12,9 mV.

La nanoemulsión resultante comprende una población de partículas, y se midieron las características de la población de partículas y de partículas individuales de la población. El 50 % del volumen agregado de todas las nanopartículas en la población eran de entre 10 nm y 39,7 nm; el 90 % de todas las nanopartículas en la población eran de entre 10 nm y 82,9 nm; y el 95 % de todas las nanopartículas en la población eran de entre 10 nm y 113,0 nm. Por lo tanto, la mayoría de partículas en la población caía entre el intervalo de 10 nm y 85 nm.

#### *Ejemplo 2: Formulación de nanopartículas de dinucleótido de timidina fosforilado (pTT)*

El dinucleótido de timidina fosforilado (pTT) es conocido por tener actividad biológica sobre estructuras cutáneas (Goukassian *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101: 3933; Arad *et al.*, 2006, *FASEB J*, 20:1895; Yaar *et al.*, 2007, *Breast Cancer Res.*, 9: R13 y Goukassian *et al.*, 2002, *FASEB J*, 16: 754). Por ejemplo, el pTT estimula la producción de melanocitos, dando como resultado el bronceado de la piel o consiguiendo la apariencia de bronceado de la piel, un efecto biológico que puede ensayarse y medirse visualmente.

Se prepara una composición de nanopartículas de pTT formando una nanoemulsión. Brevemente, se agitan 800 mg de aceite de soja y/o aceite 1349 y 800 mg de TWEEN<sup>®</sup>80 en un vial estéril durante 5 minutos. Se añade 1 mg de pTT (en 8,4 ml de agua) a la mezcla de aceite-TWEEN<sup>®</sup> y se agita durante 20 minutos. Se homogeneiza la muestra durante 1 minuto y se agita entonces durante 20 minutos. Se microfluidifica la muestra una vez a 23.000 psi.

Se evalúa en la nanoemulsión de pTT resultante el tamaño de partícula usando el calibrador de partículas Malvern Nano S. La mayoría de nanopartículas formadas son de entre 50 nm y 150 nm de diámetro.

#### *Ejemplo 3: Efectos oscurecedores de la piel sobre ratones mediante la aplicación transdérmica de una nanopartícula de nucleótidos.*

Este ejemplo demuestra la eficacia biológica sobre la piel de la aplicación transdérmica de una composición de nanopartículas de nucleótidos.

#### Procedimientos

Se mezcla una nanoemulsión de nucleótidos preparada de acuerdo con el Ejemplo 2 con un volumen igual de crema cutánea (es decir, Base PCCA Vanishing Cream Light) y se agita entonces con vórtex hasta una crema uniforme, generando la "crema de tratamiento".

Se prepara una "crema sin nanotratamiento" mezclando la misma cantidad de nucleótidos en la misma cantidad de agua que en el Ejemplo 2, y agitando entonces con vórtex con la misma cantidad de crema cutánea que se usa para preparar la crema de tratamiento. La crema sin nanotratamiento comprende todos los mismos componentes de la crema de tratamiento, pero la preparación no se somete a una alta fuerza de cizallamiento y, por lo tanto, no forma una nanoemulsión. En contraposición con la crema de tratamiento, que es una nanoemulsión que comprende un conjunto particular de ingredientes, la crema sin nanotratamiento es simplemente una combinación del mismo conjunto de ingredientes, y no se formula en forma de una nanoemulsión.

Se prepara una "crema de control" agitando con vórtex la misma cantidad de agua que en el Ejemplo 2 y con la misma cantidad de crema cutánea que se usa para preparar la crema de tratamiento. La crema de control no es una nanoemulsión y no contiene el ingrediente activo pTT.

- 5 Se adquieren 30 ratones Swiss Webster y cada uno es de aproximadamente 20 gramos de peso. Tras la llegada, se aclimatan todos los animales a sus jaulas durante 1 semana (se albergaban 10 ratones por jaula por grupo como se define a continuación) y se les proporcionan lecho de jaula estándar y pienso Purina 5001. Después de 1 semana, se aplican los siguientes paradigmas de tratamiento:

10 *Paradigmas de tratamiento*

Grupo 1 (Control): Cada día durante 3 semanas, se aplican a 10 ratones 100 µl de crema de control a cada uno de los lomos con un dedo enguantado hasta que no es visible la crema. Se afeitan los ratones con una maquinilla eléctrica antes del primer tratamiento y al inicio de cada semana posterior.

- 15 Grupo 2 (sin nanotratamiento): Cada día durante 3 semanas, se aplica a 10 ratones 100 µl de crema sin nanotratamiento a cada uno de sus lomos con un dedo enguantado hasta que no es visible la crema. Se afeitan los ratones con una maquinilla eléctrica antes del primer tratamiento y al inicio de cada semana posterior.

- 20 Grupo 3 (Tratamiento): Cada día durante 3 semanas, se aplican a 10 ratones 100 µl de crema de tratamiento a cada uno de los lomos con un dedo enguantado hasta que no es visible la crema. Se afeitan los ratones con una maquinilla eléctrica antes del primer tratamiento y al inicio de cada semana posterior.

*Valoración*

- 25 Antes del tratamiento inicial y cada semana después de ello, un observador desconocedor del estado de tratamiento de los ratones califica el tono de la piel del área tratada sobre el lomo del ratón de no bronceado (0) a muy bronceado (5).

- 30 Después de 3 semanas, se sacrifican los animales y se estudia la piel de sus lomos para determinar los efectos de tratamiento potenciales comparando medidas promedio de cada grupo de piel diseccionada de la misma región de cada lomo de ratón. Se valora la estimulación de melanocitos mediante el examen de una sección transversal histológica de la piel de lomo de ratón que se someterá a micrótopo, se colocará en un portaobjetos de vidrio y se teñirá histológicamente. Se valora el número y grado de oscuridad de los melanocitos por un patólogo desconocedor del estado de tratamiento de los ratones.

35 Resultados y conclusión

- Se espera que los resultados muestren que, en promedio, el grupo de tratamiento tiene estadísticamente más piel bronceada que el grupo control y que el grupo sin nanotratamiento. Se espera que los resultados muestren que, en promedio, el grupo de tratamiento tiene estadísticamente más estimulación de melanocitos que el grupo de control y que el grupo sin nanotratamiento medido por la valoración del patólogo de los portaobjetos teñidos histológicamente.

- 45 En suma, se espera que estos datos controlados muestren que la preparación de nanoemulsión de nucleótidos tópica tiene un efecto biológico mensurable sobre la piel cuando se compara con una crema de control sin tal nucleótido. Se espera que los datos muestren que la nanoemulsión de nucleótidos tiene un efecto biológico que es mensurablemente mayor que la crema sencilla con los mismos nucleótidos que no estaba en formulación de nanopartículas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Edelson, Jonathan  
Kotyla, Timothy  
Zhang, Boke
- 55 <120> NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO Y USOS PARA LAS MISMAS
- <130> P48731EP-K/KVC
- <140> EP08756527.1  
<141> 30-11-2009
- 60 <150> US60/941187  
<151> 31-05-2007
- <160> 48
- 65 <170> PatentIn versión 3.5

# ES 2 660 906 T3

	<210>	1	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	1	
10	aaacuuguuu	uugagggucu	20
	<210>	2	
	<211>	19	
	<212>	ARN	
15	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	2	
20	uuuuugaggg	ucuugaucu	19
	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
25	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	3	
30	uuuugagggg	cuugaucugu	20
	<210>	4	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
35	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	4	
40	uuugaggguc	uugaucuguu	20
45			
	<210>	5	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
50	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	5	
55	aaggaggcaa	acuuguuuuu	20
	<210>	6	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
60	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia anticodificante de siARN	
65			

## ES 2 660 906 T3

	<400>	6		
			aacuuguuga gggucuugau	20
5	<210>	7		
	<211>	20		
	<212>	ARN		
	<213>	Secuencia artificial		
10	<220>			
	<223>		Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	7		
			aaacuuguug agggucuugu	20
15	<210>	8		
	<211>	20		
	<212>	ARN		
	<213>	Secuencia artificial		
20	<220>			
	<223>		Secuencia anticodificante de siARN	
	<400>	8		
25			caaacuuguu gagggucuuu	20
	<210>	9		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>		ADN con motivo CpG	
	<400>	9		
35			tccatgacgt tctgacgtt	20
	<210>	10		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
40	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>		ADN con motivo CpG	
45	<400>	10		
			tccatgacgt tctgacgtt	20
	<210>	11		
	<211>	19		
50	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>		ADN con motivo CpG	
55	<400>	11		
			tccatgacgt tctgacgt	19
	<210>	12		
60	<211>	18		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
65	<223>		ADN con motivo CpG	

# ES 2 660 906 T3

	<400>	12		
	tccatgacgt	tctgacg		18
5	<210>	13		
	<211>	16		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
10	<220>			
	<223>	ADN con motivo CpG		
	<400>	13		
	tcctcgacgt	ccctga		16
15	<210>	14		
	<211>	12		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
20	<220>			
	<223>	ADN con motivo CpG		
	<400>	14		
25	catgacgttc	ct		12
	<210>	15		
	<211>	6		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>	ADN con motivo CpG		
	<400>	15		
35	gacggt			6
	<210>	16		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
40	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	ADN con motivo CpG		
45	<400>	16		
	aacgtcagga	acgtcatgga		20
	<210>	17		
	<211>	19		
50	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	VEGF/VPF anticodificante		
55	<400>	17		
	caccaagac	agcagaaag		19
	<210>	18		
60	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
65	<223>	VEGF/VPF anticodificante		

	<400>	18		
			ctccaagac agcagaaag	19
5	<210>	19		
	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
10	<220>			
	<223>	VEGF/VPF anticodificante		
	<400>	19		
			ctgccaagac agcagaaag	19
15	<210>	20		
	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
20	<220>			
	<223>	VEGF/VPF anticodificante		
	<400>	20		
25			caccaactc tccagaaag	19
	<210>	21		
	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>	VEGF/VPF anticodificante		
	<400>	21		
35			caccaagac agcagaatg	19
	<210>	22		
	<211>	19		
	<212>	ADN		
40	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	VEGF/VPF anticodificante		
45	<400>	22		
			caccaagac agcagattg	19
	<210>	23		
50	<211>	6		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
55	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
	<400>	23		
			ttaggg	6
60	<210>	24		
	<211>	11		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
65	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		

ES 2 660 906 T3

	<400>	24	
	gtagggtta g		11
5	<210>	25	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
	<400>	25	
	ggtaggtgt aggtt		16
15	<210>	26	
	<211>	9	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
	<400>	26	
25	gtagggtt		9
	<210>	27	
	<211>	9	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
	<400>	27	
35	ttaggtta		9
	<210>	28	
	<211>	15	
	<212>	ADN	
40	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
45	<400>	28	
	gtaggttta aggtt		15
	<210>	29	
50	<211>	15	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
55	<400>	29	
	gtaggtgta ggggtg		15
60	<210>	30	
	<211>	15	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
65	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	

ES 2 660 906 T3

	<400>	30		
		ggtcgggtgc gggtg		15
5	<210>	31		
	<211>	15		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
10	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
	<400>	31		
		ggcagggcga gggcg		15
15	<210>	32		
	<211>	15		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
20	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
	<400>	32		
25		gtagggta gggtt		15
	<210>	33		
	<211>	16		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
	<400>	33		
35		gataaggat tggat		16
	<210>	34		
	<211>	9		
	<212>	ADN		
40	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
45	<400>	34		
		gagtatgag		9
	<210>	35		
	<211>	9		
50	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
55	<400>	35		
		gggttaggg		9
	<210>	36		
60	<211>	11		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
65	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		

ES 2 660 906 T3

	<400>	36	
	gtagggta g		11
5	<210>	37	
	<211>	15	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
	<400>	37	
	gtaggtgta ggatt		15
15	<210>	38	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
	<400>	38	
25	gtaggtgta ggattt		16
	<210>	39	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
	<400>	39	
35	gtaggtgt aggtt		16
	<210>	40	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
40	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
45	<400>	40	
	gtaggtgg aggtt		16
	<210>	41	
	<211>	16	
50	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	
55	<400>	41	
	gtaggtt aggtt		16
	<210>	42	
60	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
65	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico	

ES 2 660 906 T3

	<400>	42		
	ggttaggta aggta			16
5	<210>	43		
	<211>	15		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
10	<400>	43		
	ggttagtgta ggggtg			15
	<210>	44		
	<211>	16		
15	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
20	<400>	44		
	gtagggta gggta			16
	<210>	45		
25	<211>	16		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
30	<400>	45		
	ggtgggtg ttggtt			16
35	<210>	46		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
40	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
	<400>	46		
45	cctgggtg ttggtggtt			20
	<210>	47		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
50	<220>			
	<223>	Secuencia de saliente 3' telomérico		
	<400>	47		
55	ggtgggtg ttggtggtt			20
	<210>	48		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
60	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido activador del receptor 9 de tipo toll		
65	<400>	48		
	tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt			24

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una suspensión o dispersión de nanopartículas que comprende una población de partículas, donde la suspensión o dispersión de nanopartículas comprende una nanoemulsión, donde la mayoría de partículas tienen diámetros entre 10 nanómetros y 300 nanómetros, y donde las nanopartículas comprenden al menos un ácido nucleico de hasta 30 nucleótidos de longitud que tiene actividad biológica en la piel, tejido subcutáneo, músculo contiguo o tejido distante, donde la nanoemulsión comprende una premezcla de al menos un aceite, un tensioactivo, agua y el ácido nucleico, donde el aceite es un triglicérido de cadena media o aceite de soja y el tensioactivo es TWEEN.
- 10 2. La suspensión o dispersión de la reivindicación 1, donde el nucleótido consiste en un dinucleótido de timidina, un dinucleótido de timidina fosforilado (pTT) o una combinación de ambos.
- 15 3. La suspensión o dispersión de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la mayoría de partículas tienen un intervalo de diámetros de entre 10 nanómetros y 250, 200, 150, 120, 100 o 50 nanómetros.
- 20 4. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la suspensión o dispersión se generó por exposición a una alta fuerza de cizallamiento o es estable.
- 25 5. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el ácido nucleico está encapsulado en las nanopartículas.
- 30 6. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el agente biológicamente activo está anidado en una membrana micelar o asociado a la superficie de partícula.
- 35 7. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la suspensión o dispersión puede penetrar la piel sin alterar ni cambiar la piel o sin el uso de potenciadores de la permeación cutánea o abrasivos.
- 40 8. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la suspensión o dispersión puede penetrar en la capa superior de la piel sin el uso de potenciadores de la permeación cutánea o abrasivos, opcionalmente donde la capa superior de la piel es la superficie del estrato córneo.
- 45 9. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el aceite y el tensioactivo o el agua y el tensioactivo están presentes a una relación que oscila de 0,5-2,0, 0,5-1,5 o 1,0 o donde el porcentaje de aceite, tensioactivo o agua en la suspensión o dispersión oscila de 1 %-30 % o de 5 % a 9 %.
- 50 10. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la suspensión o dispersión está sustancialmente libre de disolventes tóxicos.
- 55 11. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde las nanopartículas comprenden además un agente biológicamente activo adicional, opcionalmente donde el agente biológicamente activo adicional es un agente quimioterapéutico, opcionalmente donde el agente biológicamente activo adicional es dacarbazina.
- 60 12. La suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la suspensión o dispersión comprende una segunda población de partículas que comprenden un agente quimioterapéutico, opcionalmente donde el agente quimioterapéutico es dacarbazina.
- 65 13. Una composición farmacéutica que comprende la suspensión o dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, donde la composición farmacéutica se selecciona de entre el grupo consistente en una crema, una loción, un gel, una pomada, un pulverizador, un polvo, un emoliente, un lápiz de labios, un protector solar y combinaciones de los mismos.
15. Uso de una composición que comprende una suspensión, dispersión o composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para conseguir la apariencia de bronceado de la piel.
16. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 15, donde la suspensión, dispersión o composición es para administración transdérmica usando un parche adhesivo, una espátula, una torunda, una jeringa sin aguja, un dedo enguantado, un dedo no protegido o un dispositivo que permita la aplicación de la composición a un sitio diana de la piel sin aplicar la composición a sitios no diana de la piel.

17. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 15, donde todo el ácido nucleico permea la piel, o donde al menos un 99 %, 95 %, 90 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % o 1 % del ácido nucleico permea la piel.

5 18. Un procedimiento que comprende las etapas de: proporcionar la suspensión, dispersión o composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y administrar la composición a la piel para conseguir la apariencia de bronceado de la piel.